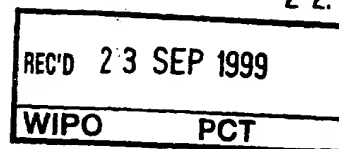


2 2. 09. 99

gk



# BREVET D'INVENTION

09 / 720045

## COPIE CERTIFIÉE CONFORME D'UNE DEMANDE INTERNATIONALE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande internationale déposée auprès de l'Institut en application du Traité de Coopération en matière de brevets (PCT) fait à Washington le 19 juin 1970.

Fait à Paris le **13 SEP. 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA REGLE  
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



2000-00-00



**L'OFFICE RÉCEPTEUR**

**PCT**

**REQUETE**

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n° **PCT/FR 98/01396**

Date du dépôt international **(30/06/98) 30 JUIN 1998**

**INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) **OM II**

**Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION NOUVEAUX PSEUDODIPEPTIDES ACYLES LEUR MODE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES EN RENFERMANT**

**Cadre n° II DEPOSANT**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

**LABORATOIRES OM SA**  
**Rue du Bois-du-Lan 22**  
**Case Postale 84**  
**1217 Meyrin 2/Genève**  
**SUISSE**

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone  
**00.41.22.783.11.11**

n° de télécopieur  
**00.41.22.783.11.22**

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : **SUISSE**

Domicile (nom de l'Etat) : **SUISSE**

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

**Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

**BAUER Jacques**  
**1162 Saint-Prex**  
**SUISSE**

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : **SUISSE**

Domicile (nom de l'Etat) : **SUISSE**

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

**Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE**

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/ a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme : ☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

**BURTIN Jean-François**  
**CABINET GEFIB**  
**85 rue Anatole France**  
**92300 LEVALLOIS PERRET**  
**FRANCE**

n° de téléphone  
**01.47.59.06.07**

n° de télécopieur  
**01.47.59.06.49**

n° de téléimprimeur

☐ Cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Feuille n° ... 02...

Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS	
<i>Si aucun des sous-cadres suivants ne sont utilisés, la présente feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)</i>  MARTIN Olivier, Richard 62bis, Avenue Dauphine 45100 ORLEANS FRANCE	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) : SUISSE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)</i>	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)</i>	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)</i>	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
<input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.	

REPLI PAR RO

## Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

## Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT *[Signature]*
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) .....

## Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

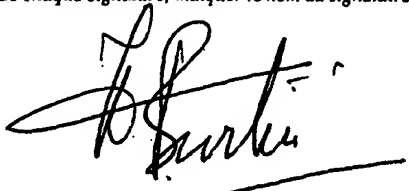
- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanie .....                                    | <input type="checkbox"/> LT Lituanie .....                              |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie .....                                    | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg .....                            |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche .....                                   | <input type="checkbox"/> LV Lettonie .....                              |
| <input type="checkbox"/> AU Australie .....                                  | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova .....                 |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan .....                                | <input type="checkbox"/> MG Madagascar .....                            |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine .....                         | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine ..... |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade .....                                    |   |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie .....                                   | <input type="checkbox"/> MN Mongolie .....                              |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil .....                                     | <input type="checkbox"/> MW Malawi .....                                |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus .....                                    | <input type="checkbox"/> MX Mexique .....                               |
| <input type="checkbox"/> CA Canada .....                                     | <input type="checkbox"/> NO Norvège .....                               |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein .....              | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande .....                      |
| <input type="checkbox"/> CN Chine .....                                      | <input type="checkbox"/> PL Pologne .....                               |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba .....                                       | <input type="checkbox"/> PT Portugal .....                              |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque .....                         | <input type="checkbox"/> RO Roumanie .....                              |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne .....                                  | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie .....                  |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark .....                                   | <input type="checkbox"/> SD Soudan .....                                |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie .....                                    | <input type="checkbox"/> SE Suède .....                                 |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne .....                                    | <input type="checkbox"/> SG Singapour .....                             |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande .....                                   | <input type="checkbox"/> SI Slovénie .....                              |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni .....                                | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie .....                             |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie .....                                    | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                          |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana .....                                      | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan .....                           |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie .....                                     | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan .....                          |
| <input type="checkbox"/> GW Guinée-Bissau .....                              | <input type="checkbox"/> TR Turquie .....                               |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie .....                                    | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago .....                     |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie .....                                  | <input type="checkbox"/> UA Ukraine .....                               |
| <input type="checkbox"/> IL Israël .....                                     | <input type="checkbox"/> UG Ouganda .....                               |
| <input type="checkbox"/> IS Islande .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique .....      |
| <input type="checkbox"/> JP Japon .....                                      |   |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya .....                                      | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan .....                           |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan .....                               | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam .....                              |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée ..... | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie .....                           |
|  | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe .....                              |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée .....                        |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan .....                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie .....                               |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                                  |   |
| <input type="checkbox"/> LR Libéria .....                                    |   |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho .....                                    |   |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☐ .....
- ☐ .....
- ☐ .....

Outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, sauf la désignation de .....

Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

<b>Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE</b>		D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire <input type="checkbox"/>	
La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :			
Pays (dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Demande n°	Office de dépôt (seulement s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale)
(1)			
(2)			
(3)			
Cocher la case ci-dessous si la copie certifiée conforme de la demande antérieure doit être délivrée par l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur (une taxe peut être exigée) : <input type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer, et de transmettre au Bureau international, une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____			
<b>Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE</b>			
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / _____ Recherche antérieure Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette administration et si cette administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de cette recherche antérieure. Pour permettre d'identifier cette recherche ou cette demande de recherche, donner les renseignements demandés ci-après pour la demande de brevet pertinente (ou sa traduction) ou pour la demande de recherche : Pays (ou office régional) : _____ Date (jour/mois/année) : _____ Numéro : _____			
<b>Cadre n° VIII BORDEREAU</b>			
La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant : 1. requête : 4 feuilles 2. description : 29 feuilles 3. revendications : 8 feuilles 4. abrégé : 1 feuille 5. dessins : 15 feuilles <b>Total : 57 feuilles</b>		Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général 3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) : _____ 5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés 7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette) 8. <input type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : _____	
La figure n° _____ des dessins (le cas échéant) est proposée pour publication avec l'abrégé.			
<b>Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE</b>			
A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.			
		BURTIN Jean-François CABINET GEFIB	

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : <b>30 JUIN 1998</b> (30/06/98)	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale indiquée par le déposant : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

Réservé au Bureau international	
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	

**NOUVEAUX PSEUDODIPEPTIDES ACYLES**  
**LEUR MODE DE PREPARATION ET LES**  
**COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES EN RENFERMANT**

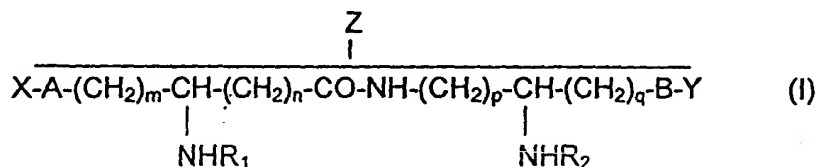
- 5 La présente invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement au domaine de la chimie thérapeutique.

Elle a plus particulièrement pour objet des pseudodipeptides dérivés d'acides aminés hydroxylés et dont les fonctions amine sont amidifiées par des acides gras.

10

Elle a spécifiquement pour objet des pseudodipeptides N-acylés dont au moins un groupe hydroxyle est estérifié par un groupement acide sous forme neutre ou chargée, répondant à la formule générale

15



- 20 dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou des substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en  $C_1 - C_{24}$ ) thio

les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur variant de 0 à 10

- 25 X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide sous forme neutre ou chargée, avec la limitation que l'un au moins des substituants X et Y représente un groupe acide sous forme neutre ou chargée,

A et B représentent chacun, distinctement l'un de l'autre, un atome d'oxygène, de soufre ou le groupe imino -NH-,

- 30 et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un groupe Z

Les groupes acides X et Y sont choisis parmi les groupements :

- 35 - carboxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$   
 - CH- $[(CH_2)_m\text{COOH}] [(CH_2)_n\text{COOH}]$  avec  $m = 0$  à 5 et  $n = 0$  à 5

- phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]
  - dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]
  - diméthoxyphosphoryl
  - dihydroxyphosphoryl
  - 5 - hydroxysulfonyl
  - hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]
  - hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]
- 10 Le groupe Z remplaçant un atome d'hydrogène du pseudodipeptide est constitué d'un bras espaceur fonctionnalisé et pouvant être couplé, par une liaison covalente ou non-covalente, à un antigène de nature protéinique, oligosaccharidique ou oligonucléotidique, à un glycoconjugué, ou à un composé portant un pharmacophore et susceptible d'être clivé par une réaction de nature chimique, physique,
- 15 biochimique ou physiologique.

Lorsque les substituants X et/ou Y représentent un groupe acide sous forme neutre, il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique ou phosphorique libre. Lorsqu'il s'agit d'un groupe acide sous forme chargée il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique

20 ou phosphorique salifiée, notamment par addition d'une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible. Lorsque les bases ne sont pas thérapeutiquement compatibles, elles peuvent servir de moyen d'identification, de purification ou de dédoublement.

25 Le même raisonnement s'applique au cas où X et/ou Y représentent un groupe carboxyalkyl, ou alkylènebiscarboxylique, hydroxysulfonyl, hydroxysulfonylalkyl, hydroxysulfonyloxyalkyle, phosphonoalkyle, phosphoryloxyalkyl.

Parmi les bases salifiantes thérapeutiquement compatibles on citera notamment les

30 bases alcalines comme les hydroxydes de sodium, de potassium, de lithium, les sels d'ammonium ; les bases alcalinoterreuses comme les hydroxydes de calcium ou de strontium, les sels de magnésium, les sels de métaux ferreux et similaires, les bases organiques comme celles dérivées d'amines primaires, secondaires ou tertiaires comme la méthylamine, la diéthylamine, la monoéthanolamine, la diéthanolamine, la



benzylamine, la N-méthylbenzylamine, la véatrylamine, la triméthoxybenzylamine, des aminoacides à réaction basique comme la lysine ou l'ornithine ou des sucres aminés.

- 5 Des bases non utilisables thérapeutiquement sont par exemple la brucine, la strychnine, l'agmatine, l'homarine, la glucosamine, la N-méthylglucosamine ou la N-méthylmorpholine.

- 10 Lorsque m est égal à 1 et n est égal à 0, la molécule dérive de la sérine. Lorsque m est égal à 2 et n est égal à 0, la molécule dérive de l'homosérine. Lorsque m est égal à 3 et n est égal à 0, il s'agit d'un dérivé de la pentahomosérine. Lorsque m est égal à 4 et n est égal à 0, il s'agit d'un dérivé de l'hexahomosérine.

- 15 Lorsque p est égal à 3 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de la citrulline ou de l'ornithine ou de l'arginine. Lorsque p est égal à 4 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de la homoarginine ou de la lysine

Parmi les pseudodipeptides objet de l'invention, on retiendra particulièrement comme composés actuellement préférés :

- 20
- les 1 et/ou 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et leurs sels.
  - le 1,10-bis(dihydrogénophosphate) de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels.
  - le 1,10-bis(dihydrogénophosphate) de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels.
- 25
- le 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels.
  - le 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadecane 1,10-diol et ses sels.
- 30

- le 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadecane 1,10-diol et ses sels.

La définition de  $R_1$  et  $R_2$  englobe des dérivés acyles à longue chaîne, identiques ou différents, ramifiés ou en chaîne droite, saturés ou insaturés, pouvant porter un ou plusieurs substituants alkyle, amino, acylamino, hydroxyl, alkoxyl, acyloxy, acylthio, alkylthio.

Un exemple de tels substituants est le radical ricinoléyle, 12-hydroxystéaroyle, 2-hydroxy-3-méthylbutyroyle, 3-hydroxy-2-aminopentanoyle, palmitoléyle, élaidyle, éleostearoyle, arachidoyle, arachidonyle, gadoléyle, béhényle, érucyle, 8-méthyldécanyole, 9-méthyldécanyole, docosahéxaénoyle ou eicosapentaénoyle.

Parmi les groupements acyle concernés, l'acide 3-hydroxymyristique et l'acide 3-lauryloxy-myristique sont parmi les préférés.

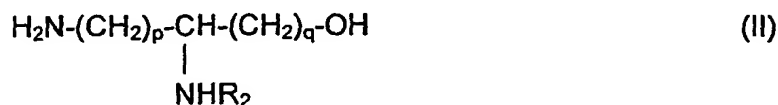
Les composés de formule générale I et notamment les composés mono et bis phosphorylés désignés sous le nom de code MP et DP, respectivement, se distinguent par des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment immunomodulatrices. Ils trouvent un intérêt particulier dans la thérapeutique des maladies liées à une déficience des défenses immunitaires ou à une exagération des réponses immunitaires, selon les doses utilisées. Ils trouvent également une utilisation comme vecteur de molécule d'intérêt thérapeutique après couplage physique ou chimique avec une molécule par l'intermédiaire d'un bras espaceur ou l'un ligand approprié.

Ils peuvent être utilisés par voie orale, parentérale, rectale, topique, percutanée ou muqueuse.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention des pseudodipeptides de formule générale I, qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position  $(q+1)$  et  $\omega$  d'un acide diaminé par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool

correspondant, libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $R_2OH$  dans laquelle  $R_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II

5

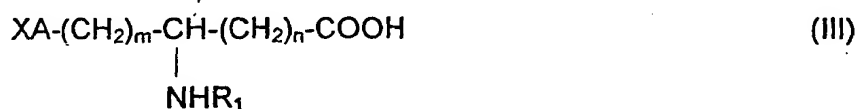


10 dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un

15 solvant inerte, avec un dérivé d'un  $\omega$ -hydroxy, amino ou thio amino acide de formule générale III



20

dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment,

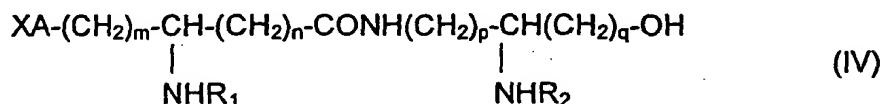
25 m est un nombre entier variant de 1 à 10

et n est un nombre entier variant de 0 à 10.

et X est un groupe acide défini comme précédemment présent éventuellement sous forme estérifiée

pour former le pseudodipeptide de formule générale IV

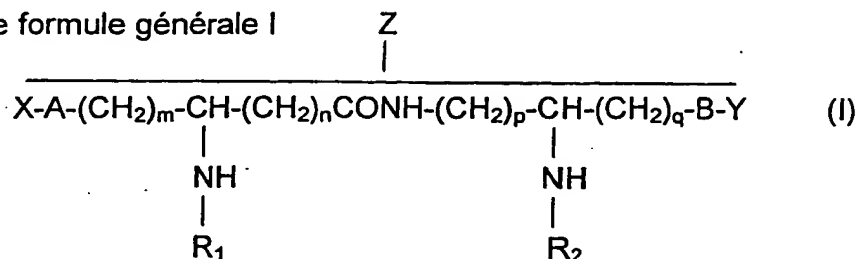
30



35 dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$ , et les descripteurs m, n, p et q sont définis comme précédemment,

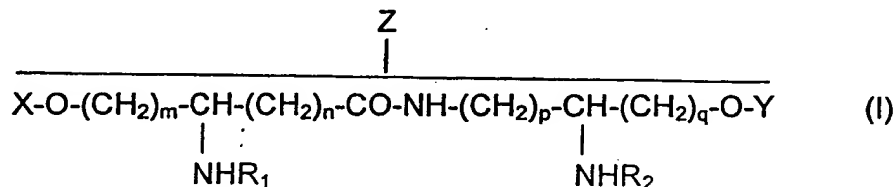
dont on peut -si désiré- substituer, alkyliser ou acyler la fonction alcool par un réactif approprié en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une

hydrogénation catalytique ou à une autre méthode de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I



dans laquelle A, B et les substituants X, Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, n, m, p et q ont les significations fournies antérieurement,  
et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un bras espaceur fonctionnalisé Z

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale I



dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

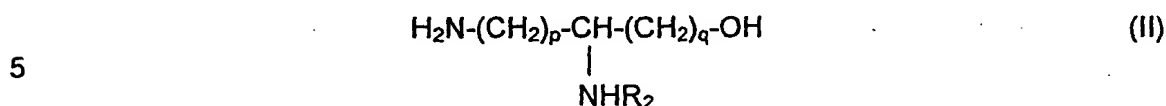
le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe dihydroxyphosphoryle

et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un bras espaceur fonctionnalisé

qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un acide diaminé de formule H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q-1</sub> COOH par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R<sub>2</sub>OH dans laquelle R<sub>2</sub> est défini

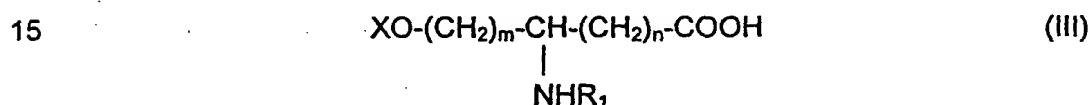
comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II



dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

$p$  et  $q$  représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d' $\omega$ -hydroxy amino acide de formule générale III

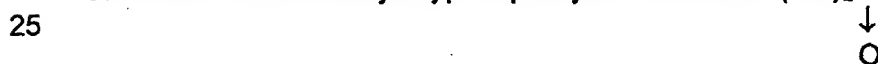


dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

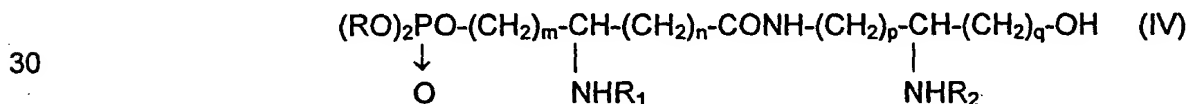
$m$  est un nombre entier variant de 1 à 10

$n$  est un nombre entier variant de 0 à 10

et  $X$  est un radical diaryloxyphosphoryle de formule  $-(\text{RO})_2\text{P}$

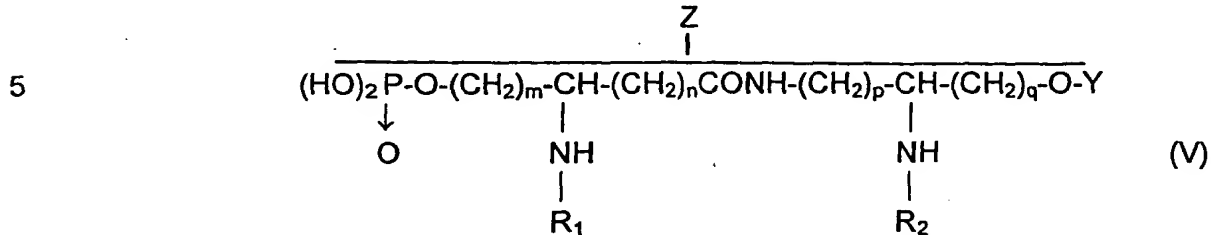


pour former le pseudodipeptide de formule générale IV



dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment, et  $R$  est un radical labile par hydrogénolyse, défini comme ci-dessus dont on peut -si désiré- phosphoryler l'autre fonction alcool par un agent de phosphorylation en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une hydrogénation catalytique en deux étapes pour débloquer la fonction alcool éventuellement présente sur le groupe acyle  $R_2$  et la fonction phosphate puis

débloquer par hydrogénolyse la deuxième fonction phosphate éventuellement présente, de façon à obtenir le dérivé de formule générale V



10 dans laquelle Y représente soit un hydrogène soit un groupe phosphono et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un bras espaceur fonctionnalisé

et si désiré, on effectue les étapes supplémentaires de salification à l'aide d'une base minérale ou organique, et/ou de couplage avec des antigènes de nature protéinique, oligosaccharidique ou oligonucléotidique, avec un glycoconjugué ou avec un composé portant un pharmacophore, en faisant intervenir la fonction portée par le bras espaceur.

La stéréochimie des centres porteurs de groupes acylamino est déterminée par la configuration des acides aminés de départ et celle des groupes acylamino par la configuration des acides gras de départ. On peut partir d'un diamino acide de configuration L ou D ou racémique. On peut partir d'un acide aminé hydroxylé de configuration L, D ou racémique. Tous ces stéréoisomères ou diastéréoisomères font partie de l'invention.

25

Le procédé selon l'invention peut encore être défini par les modalités d'exécution suivantes actuellement préférées (Schéma de synthèse I):

1. Le blocage de la fonction amine en  $\omega$  sur la chaîne d'un dérivé d'ornithine est effectué par N-benzyloxycarbonylation après réaction initiale de la fonction acide avec un sel de cuivre, en milieu alcalin, réaction de ce carboxylate de cuivre avec du chloroformiate de benzyle et libération de la fonction carboxylique par chélation du cuivre en milieu acide, pour obtenir le dérivé N-benzyloxycarbonylé, selon une méthode décrite dans « Organic Preparations and Procedures International 23 (1992) 191-194 ».

2. Le blocage de la fonction amine en  $\alpha$  du carboxyle du dérivé de l'ornithine est effectué par terbutyloxycarbonylation au moyen de pyrocarbonate de terbutyle en milieu basique.

5 Le pyrocarbonate de terbutyle réagit avec la fonction amine proximale pour former le dérivé  $\omega$ -benzyloxycarbonylamino  $\alpha$ -terbutyloxycarbonylamino carboxylique.

3. La conversion de la fonction carboxylique en fonction alcool primaire est réalisée en appliquant la méthode décrite dans Tetrahedron Letters 32 (1991) 923-926 qui consiste en ce que l'on fait réagir le dérivé carboxylique avec un chloroformiate d'alkyle, comme le chloroformiate d'isobutyle, pour former un anhydride mixte que  
10 l'on réduit au moyen d'un borohydrure de métal alcalin ou alcalino-terreux, pour conduire au dérivé correspondant ayant une fonction alcool primaire.

4. L'élimination du groupe terbutyloxycarbonyl en  $\alpha$  est effectuée par action de  
15 l'acide trifluoroacétique qui conduit à la formation du trifluoroacétate de la fonction amine.

5. L'acylation de la fonction amine en  $\alpha$  de la fonction alcool est effectuée au départ du sel trifluoroacétique au moyen d'un anhydride mixte préparé à partir de l'acide  
20  $R_1$  COOH et d'un chloroformiate d'alkyle.

6. La libération de la fonction amine terminale est réalisée par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur à base de métal noble comme le palladium sur charbon.

25 7. Le couplage peptidique entre le composé aminé de formule II et le dérivé phosphorylé de formule III est effectué en présence d'un agent de couplage tel que la 1-isobutyloxy 2-isobutyloxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine dans un solvant inerte tel qu'un solvant halogéné.

On obtient ainsi un pseudodipeptide de formule générale (V) dont la fonction  
30 hydroxyle éventuellement portée par le groupe acyle  $R_2$  est bloquée.

8. La libération de la fonction hydroxyle du groupe acyle  $R_2$  intervient par hydrogénolyse en présence d'un métal noble comme le palladium sur charbon.

9. La libération du groupe phosphorique X est effectuée par hydrogénation catalytique en présence d'oxyde de métal noble comme l'oxyde de platine.

10. La phosphorylation du dérivé pseudodipeptique IV est effectuée en deux étapes (Helv. Chim. Acta 70 (1987), 175). Dans une première étape le composé IV est soumis à l'action d'un N, N-dialkyl phosphoramidite de dialkyle ou de diaryle, en présence d'un agent de couplage tel que le [1H]-tétrazole dans un solvant polaire tel que le tétrahydrofurane, le phosphite ainsi formé est ensuite oxydé en phosphate à l'aide d'un acide peroxy-carboxylique aromatique comme par exemple l'acide peroxyphthalique, l'acide m-chloroperbenzoïque ou l'acide nitroperbenzoïque. La libération du groupe phosphorique Y est réalisée par hydrogénation catalytique en présence d'un métal noble comme le palladium sur charbon.

11. La phosphorylation du dérivé de l'homosérine est effectuée après blocage de la fonction amine par tert-butoxycarbonylation au moyen du pyrocarbonate de tert-butyle en milieu basique et blocage de la fonction carboxyle après formation d'un sel de césium, et benzoylation à l'aide d'un halogénure de benzyle dans le diméthylformamide ou le diméthylacétamide, à l'aide d'un halogénure de diphénylphosphoryle en présence de pyridine et d'une N, N-dialkylaminopyridine (Helv. Ch. Acta 58, (1975), 518).

12. L'acylation de l'azote du dérivé d'homoserine s'effectue après déprotection de la fonction amine par l'acide trifluoroacétique pour obtenir le sel trifluoroacétique de l'amine, et réaction avec un anhydride mixte résultant de la réaction entre l'acide carboxylique  $R_1$  OH et un chloroformiate d'alkyle en présence d'une amine réactive telle que la N-méthylmorpholine.

L'invention concerne encore les produits intermédiaires de formule générale II ou de formule générale III, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme racémique.

L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I, sous forme neutre ou



chargée, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

5 L'invention concerne plus particulièrement les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un sel d'un composé de formule générale I, avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.

10 L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques à base d'un composé de formule générale I, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme racémique, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule pharmaceutique.

15 Parmi les formes pharmaceutiques envisagées on pourra citer celles qui conviennent pour la voie digestive, parentérale, inhalation, topique, transdermique ou permuqueuse comme par exemple les comprimés, les dragées, les gélules, les solutés ou suspensions injectables, aérosols, les gels, les emplâtres ou les solutés pénétrants.

20 Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter. Ils sont présentés dans les schémas de synthèse I, II et III :

#### EXEMPLE I

##### O-Diphenyloxyphosphorylhomosérinate de benzyle

##### 1. DL - N<sup>o</sup> - terbutyloxy-carbonyl homosérine

25 2g d'homosérine (16,78 mmol) ont été dissouts dans 20ml d'eau et on a additionné cette solution de 16,78ml de NaOH 1M et de 3,006g de carbonate de césium (9,23 mmol). Après 5 minutes d'agitation, la solution est refroidie dans un bain d'eau et de glace. On ajoute alors 60ml de dioxane et du pyrocarbonate de terbutyle. Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation dans un bain d'eau glacée  
30 pendant une heure puis à température ambiante pendant 5 heures. Le solvant a été ensuite éliminé sous vide. Le résidu sec a été employé directement pour l'étape suivante.

##### 2. DL - N<sup>o</sup>-terbutyloxy-carbonylhomosérinate de benzyle

Au résidu du stade 1, on ajoute 20ml de diméthylformamide pour effectuer l'évaporation à siccité puis on additionne le milieu réactionnel de 60ml de diméthylformamide et de 4,5ml de bromure de benzyle (20,13 mmol). Il se forme alors un précipité blanc. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 16 heures.

- 5 Le solvant a été ensuite chassé sous vide. Le résidu a été épuisé avec 2 fois 20ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée avec de l'eau (20ml) puis avec de la saumure (20ml) respectivement, puis séchée sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant est évaporé et le résidu est utilisé tel quel pour la prochaine étape.

10 3. DL - N<sup>α</sup>-terbutyloxycarbonyl-O-diphényloxyphosphorylhomosérinate de benzyle

- Le résidu de l'étape précédente a été séché sous vide poussé puis dissout dans le chlorure de méthylène (60ml). On ajoute alors 4,11g de 4-diméthylaminopyridine (33,56 mmol) dans la solution, le mélange réactionnel a été agité pendant 10 minutes, et on ajoute alors 12ml de pyridine et 6,95ml de chlorophosphate de diphényle (33,56 mmol). La solution a été agitée à température ambiante pendant 18 heures puis lavée avec de l'acide chlorhydrique N (5 X 20ml), de l'eau (30ml) et par une solution saline (30ml). La phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium anhydre, le solvant a été chassé sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie flash (hexane/acétate d'éthyle = 4 : 1). La fraction principale a été concentrée et le résidu cristallisé. On obtient ainsi 7,4894g de produit phosphorylé soit un rendement de 82,4 %. Point de fusion : 63,5 - 64,0° C.

4. O-diphényloxyphosphorylhomosérinate de benzyle

- Le produit phosphorylé de l'étape précédente (7,88g soit 15,4 mmol) a été dissout dans 15ml d'acide trifluoroacétique et la solution a été maintenue sous agitation à température ordinaire pendant 2,5 heures. Le solvant a été alors chassé sous vide poussé, le résidu sec a été purifié par chromatographie flash (MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10 : 1). La fraction principale a été concentrée et le résidu a été cristallisé à température ordinaire. On obtient ainsi 7,17g de produit phosphorylé (rendement 88,9 %).

30

5. 2-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-butanoate de benzyle

4,284g (10,07mmol) d'acide (R) 3-dodécanoyloxytétradécanoïque préparé selon la méthode décrite dans Bull.Chem.Soc.Jpn, 60 (1987), 2205 ont été dissous dans

30ml de tétrahydrofurane et la solution a été mise à refroidir jusqu'à -15°C dans un bain de saumure glacée. On a alors ajouté 1,108ml (10,07mmol) de N-méthylmorpholine et 1.31ml (10.07 mmol) de chloroformiate d'isobutyle. On a poursuivi l'agitation pendant 30 minutes. On a alors ajouté au mélange réactionnel

5 5,724g (10,07mmol) de O-diphényloxyphosphorylhomosérinate de benzyle dans un mélange de 30ml de tétrahydrofurane et de 5ml de triéthylamine. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, le solvant a été chassé sous vide et on a ajouté 20ml d'eau au résidu. Le mélange a été ensuite épuisé avec de l'acétate d'éthyle (2 x 30ml). Les phases organiques ont été combinées, lavées

10 successivement avec de l'eau (20ml) et avec de la saumure (20ml) et séchées sur sulfate de magnésium. Le solvant a été évaporé et le résidu a été purifié par chromatographie flash (hexane - acétate d'éthyle = 2:1, R<sub>f</sub> = 0,29) rendement 7,455g soit 87,1 % PF = 31,0° - 32,1°C.

15 6. Acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) butanoïque

On prépare une solution de l'ester benzylique obtenu à l'étape 5 (84,9mg soit 0,1mmol) dans 20ml d'éthanol dans un ballon à trois tubulures et on y ajoute 40mg de noir palladié à 20 % de palladium. On purge le contenu du ballon pour chasser

20 l'air, sous vide puis le ballon a été chargé avec de l'hydrogène.

Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 3 heures, le catalyseur a été ensuite éliminé par filtration et le filtrat a été concentré pour fournir un sirop incolore. Celui-ci était homogène en chromatographie en couche mince et en RMN et a été utilisé directement sans purification supplémentaire pour l'étape de

25 couplage.

Alternativement, l'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-(dodécanoyloxytétradécanoylamino) butanoïque est préparé à partir de l'acide aspartique D ou L par réaction avec de l'anhydride trifluoroacétique en grand excès, formation sélective de

30 l'ester benzylique de la fonction acide proximale, réduction de la fonction carboxylique restée libre en alcool primaire par l'intermédiaire d'un anhydride mixte, phosphorylation de l'alcool primaire, élimination du groupe protecteur de la fonction amine, acylation de l'amine avec l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque, et hydrogénolyse de l'ester benzylique (Schéma de synthèse III).

## EXEMPLE II

### Préparation du 5-amino-2-(3-benzyloxytétradécanoylamino)-pentan-1-ol

#### 1. Sel de cuivre de la D-ornithine

- 5 A une solution de D-ornithine (5,25g soit 30 mmol) dans 30ml de soude 1M, on a ajouté 50ml d'une solution de sulfate cuivrique pentahydraté (3,814g soit 15,3 mmol) dans de l'eau. L'agitation a été poursuivie pendant 2 heures. On a alors évaporé le solvant à siccité. On ajoute 60ml de méthanol pour former un solide de couleur pourpre que l'on sépare, lave au dioxane et au méthanol respectivement.

10

#### 2. 5-(Benzyloxycarbonylamino)- 2-(aminopentanoate) de cuivre

- Le solide pourpre a été dissout dans 40ml de soude 1M et 70ml de dioxane, la solution a été refroidie dans un bain d'eau glacée et on y a ajouté 5,14ml (soit 36 mmol) de chloroformiate de benzyle. L'agitation est poursuivie dans un bain d'eau glacée pendant 3 heures et ensuite à température ordinaire pendant 15 heures. Le précipité pourpre a été rassemblé puis lavé à l'éthanol à 95 % (40ml), à l'eau (50ml) et à l'éthanol (60ml) respectivement. Le précipité a été séché à l'étuve ( $T < 45^{\circ} \text{C}$ , sous vide) -(rendement en deux étapes est de 8,27 g, 8,27g en deux stades soit 93 % par rapport à la théorie).

20

#### 3. Acide 5-(benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentanoïque

- Le sel de cuivre a été dissout dans de l'acide chlorhydrique 2M (400ml) et on y a ajouté de l'EDTA (8,15g, 27,8 mmol). On a agité le mélange pendant 2,5 heures, puis on l'a neutralisé à pH7 en ajoutant de la soude 5M (environ 160ml). Il se forme un précipité blanc. Le mélange a été agité pendant 2,5 heures dans un bain d'eau glacée. Le précipité a été filtré, lavé à l'eau froide jusqu'à ce que l'effluent soit incolore, puis séché à l'étuve en dessous de  $60^{\circ}$ . Ce solide a été dissout dans 156ml de NaOH M et la solution refroidie au bain d'eau glacée. On a ajouté à cette solution 7,7g (35,2 mmol) de pyrocarbonate de terbutyle dans le dioxane (160ml). Le mélange réactionnel a été agité à  $0^{\circ} \text{C}$  pendant 45 minutes puis pendant 16 heures à température ambiante. Le solvant organique a été évaporé et on a ajouté 70ml d'acétate d'éthyle. On acidifie ensuite la phase aqueuse en ajoutant de l'acide chlorhydrique 2N jusqu'à pH ~3. La couche aqueuse a été épuisée encore une fois avec 100ml d'acétate d'éthyle. Les couches organiques ont été combinées et lavées

30

à l'eau (30ml) et avec une solution saline (30ml). Le solvant a été éliminé sous vide de façon à fournir une huile incolore après purification par chromatographie flash (Rdt : 8,42g en deux étapes soit 76,7 % de la théorie) ( $R_f$  = 0,19 dichlorométhane - MeOH 20 : 1).

5

4. 5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentan-1-ol

A une solution froide (-15° C) du dérivé de l'acide diamino pentanoïque précédent (5,45g soit 14,8 mmol) dans 60ml de THF, on a ajouté 1,654ml (soit 14,8 mmol) de N-méthylmorpholine et 9,6ml (soit 14,8 mmol) de chloroformiate d'isobutyle (IBCF).

- 10 La solution a été agitée à -15° C pendant 1 minute puis on y a ajouté une solution de borohydrure de sodium (5,104g soit 44,6 mmol) dans 10ml d'eau. L'agitation a été maintenue à -15° C pendant encore 10 minutes puis on a ajouté 400ml d'eau pour arrêter la réaction. La solution a été épuisée avec de l'acétate d'éthyle (100ml X 2). Les couches organiques ont été combinées et lavées avec 50ml d'eau et avec 60ml
- 15 de solution saline puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant a été chassé et le résidu a été cristallisé du mélange acétate d'éthyle/hexane (4,94g rendement 94,9 %) PF = 47,5 - 48° C.

5. Déblocage du dérivé du 2,5 diaminopentan-1-ol

- 20 6,32g (18 mmol) de 5-benzyloxycarbonylamino 2-terbutyloxycarbonylamino pentan-1-ol ont été dissouts dans 25ml d'acide trifluoroacétique puis agités pendant 2,5 heures à température ambiante. Le solvant a été ensuite évaporé et le résidu a été purifié par chromatographie flash (MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10:1). On obtient ainsi une masse vitreuse incolore qui fond à température ambiante. Le rendement est de
- 25 5,45g de sel trifluoroacétique (rendement = 82,7 %). Le chlorhydrate fond à 133,0 - 134,3° C (recristallisation du méthanol).

6. 5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-(3-benzyloxytétradécanoylamino)]pentan-1-ol

- On a ajouté à une solution refroidie à -15° C de 5,27g (15,8 mmol) d'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque (Bull. Chem. Soc. Jpn, 60 (1987), 2197) dans 30ml de tétrahydrofurane, 1,89ml (15,8 mmol) de N-méthylmorpholine et 2,21ml d'IBCF (15,8 mmol). Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation à -15° C pendant 30 minutes. Alors 5,25g de sel trifluoroacétique de l'exemple précédent (14,4 mmol) dans 30ml de tétrahydrofurane et 1,44ml de triéthylamine ont été ajoutés à la

solution. L'agitation a été poursuivie à température ambiante pendant 16 heures puis on a ajouté 30ml d'eau et 60ml d'acétate d'éthyle : la phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été épuisée une fois de plus avec de l'acétate d'éthyle (60ml). Les couches organiques ont été combinées et lavées à l'eau (30ml) et avec une solution saline (30ml) puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant a été évaporé et le résidu a été recristallisé d'un mélange acétate d'éthyle/hexane (5,8236g, soit un rendement de 71,2 %), PF = 117,5° C - 118° C.

7. 5-amino 2-[(R) 3-(benzyloxytétradécanoylamino)]pentan-1-ol

300mg de palladium sur charbon à 20 % ont été ajoutés à la solution de 5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R) 3-benzyloxytétradécanoylamino] pentan-1-ol (586mg = 1 mmol) et 1ml de triéthylamine dans 20ml d'éthanol dans un ballon à trois tubulures. On a chassé l'air par mise sous vide puis le ballon a été chargé d'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 3 heures puis le catalyseur a été séparé par filtration et le filtrat a été concentré pour fournir un solide blanc homogène en CCM, utilisé tel quel pour le stade suivant sans autre purification.

EXEMPLE III

Préparation du 1-(dihydroxyphosphoryloxy)-3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino) - décane-10-ol

1. On disperse dans une solution d'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)butanoïque (1,0 mmol) obtenu à l'exemple 1, dissous dans 20ml de chlorure de méthylène, 363,6mg (1,2 mmol) d'IIDQ (1-isobutyloxy-2-isobutyloxy-carbonyl-1,2-dihydroquinoléine). On a ajouté après 15 minutes d'agitation 1,0 mmol de 5-amino-2-(benzyloxytétradécanoylamino)pentan-1-ol obtenu à l'exemple 2, dissout dans 10ml de chlorure de méthylène et le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation pendant une nuit.

La solution a été concentrée et le résidu a été purifié par chromatographie flash ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / acétone = 5:2, Rf 0,23). Le solvant a été chassé et on a ainsi obtenu un sirop incolore (0,620g soit un rendement de 52,7 %) de nouveau pseudodipeptide phosphorylé.

2. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy) 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo 5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino)décan-10-ol.

La solution de pseudodipeptide (150mg soit 0,13 mmol) obtenu ci-dessus et d'acide acétique (0,6ml) dans 20ml d'éthanol a été placée dans un ballon à trois tubulures et on y ajoute 40mg de palladium sur charbon à 20 % de Pd. On purge l'air par mise sous vide puis le ballon a été chargé avec de l'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant une nuit puis le catalyseur a été séparé par filtration, le solvant a été chassé sous vide et on purifie le produit par chromatographie flash (CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> / acétone = 5:4, R<sub>f</sub> 0,24) ; on obtient un solide vitreux (104,3mg, soit un rendement de 74 %).

3. 1-(Dihydroxyphosphoryloxy)-3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo-5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino)-décan-10 - ol.

On a ajouté la solution de 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo-5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino) décan-10-ol (90mg soit 0,83 mmol) dans l'éthanol (30ml) à 30mg d'oxyde de platine dans un ballon à trois tubulures. On a chassé l'air par mise sous vide poussé, puis le ballon a été chargé avec l'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant une nuit, le catalyseur a été séparé par filtration, le solvant a été chassé sous vide et on obtient finalement 60mg d'un solide blanc soit un rendement de 77,6 % (R<sub>f</sub> 0,50 dans un mélange chloroforme / méthanol / eau 6:4:0,6) de dérivé phosphorylé.

EXEMPLE IV

Préparation du 1,10-bis(dihydroxyphosphoryloxy)-3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo-5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino)décane.

La phosphorylation du 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo-5-aza-9-(3-benzyloxytétradécanoylamino)décan-10-ol en position 10 est effectuée en deux étapes : phosphitylation avec le N,N-diéthylphosphoramidite de diéthyle ou de dibenzyle, en présence de [1H]-tétrazole dans le tétrahydrofurane, puis oxydation du phosphite ainsi formé avec de l'acide m-chloroperoxybenzoïque à -20° C. Le dérivé diphosphorylé ainsi

obtenu (Rf 0,64 dichlorométhane-acétone 5:2) est soumis à une hydrogénation catalytique en deux étapes : (a) en présence de palladium (20 % Pd/C) pour éliminer l'éther benzylique du groupe 3-benzyloxytétradécanoyl et les substituants benzyle liés à la fonction phosphate, ce qui fournit le composé 1-  
 5 (diphenyloxyphosphoryl)-3-(3-dodecanoyloxytétradécanoylamino)-4-oxo-5-aza-9-(3-hydroxytétradécanoylamino)-10-phosphoryloxydécane (Rf 0,63, chloroforme-MeOH-eau 6:4:0,6), puis (b) en présence d'oxyde de platine pour éliminer les esters de phényle de la deuxième fonction phosphate, et donner le composé bis dihydrogénophosphate libre (Rf 0,16, chloroforme-MeOH-eau 6:4:0,6).

## 10 CONTROLE ANALYTIQUE DES COMPOSES SELON L'INVENTION

A. Vérification de la pureté des produits par HPLC (MP 1 et 2 = monophosphate, DP 1 et 2 = diphosphate)

### 15 Produit diphosphorylé

Le produit (DP1 et DP2) a été solubilisé dans 10ml d'eau + isopropanol (1:1 v/v) avec de la triéthylamine pour obtenir un pH entre 8 et 9.

20 La purification a été effectuée par HPLC en phase inverse sur colonne 40 mm X 200 mm C18 Bondapack 15-20  $\mu$ m 300 Å (Waters PrepPak) au moyen de deux phases mobiles (A) eau + isopropanol à 50 mM bicarbonate d'ammonium (1:1, v/v) et (B) eau + isopropanol à 50 mM bicarbonate d'ammonium (2:8, v/v) avec un débit de 40 ml/min. Gradient selon le tableau suivant :

Temps (min)	% phase mobile (B)	Type de gradient
0	40	
10	74	linéaire
21	80	isocratique
40	80	isocratique

25 Les fractions contenant le sel d'ammonium du diphosphate éluent entre 31 et 37 min. Les fractions contenant le diphosphate sont rassemblées et concentrées par adsorption sur colonne C18 Bondapack 15-20  $\mu$ m 300 Å et le sel de sodium du diphosphate a été obtenu par lavage au moyen d'une solution eau + isopropanol  
 30 (9:1, v/v) contenant du NaCl (10g/L). Après élimination de l'excédent de NaCl par



passage de 5 volumes d'eau sur la colonne, le diphosphate a été élué par le méthanol à 100 %. Le méthanol de la fraction contenant le diphosphate est ensuite évaporé à sec au Rotavapor, puis le diphosphate est séparé par séchage sous vide partiel pendant 60 minutes. La solubilisation a été effectuée dans le volume nécessaire d'eau additionnée de 0.05 % de triéthylamine qui favorise la

#### Produit monophosphorylé

Le monophosphate (MP1 et MP2) a été solubilisé dans 40ml d'un mélange eau + isopropanol (1:1, v/v) avec de la triéthylamine pour obtenir un pH entre 8 et 9. La purification a été effectuée par HPLC en phase inverse sur colonne 40 mm X 200 mm C18 Bondapack 15-20 µm 300 Å (Waters PrepPak) au moyen de deux phases mobiles (A) eau + isopropanol à 50 mM bicarbonate d'ammonium (1:1, v/v) et (B) eau + isopropanol à 50 mM bicarbonate d'ammonium (2/8, v/v) avec un débit de 40ml/min. Gradient selon le tableau suivant :

Temps (min)	% phase mobile (B)	Type de gradient
0	40	
10	74	linéaire
22	76	isocratique
26	78	isocratique
30	80	isocratique
37	82	isocratique
39	84	isocratique
40	90	isocratique
50	90	isocratique

Les fractions contenant le sel d'ammonium du monophosphate éluent entre 41 et 47 min. Les fractions contenant le monophosphate sont rassemblées et concentrées par adsorption sur colonne C18 Bondapack 15-20 µm 300 Å et le sel de sodium du monophosphate a été obtenu au moyen d'une solution eau + isopropanol (9:1, v/v) contenant du NaCl (10g/L). Après élimination de l'excédent de NaCl par passage de 5 volumes d'eau sur la colonne, le monophosphate a été élué par le méthanol à 100 %. Le méthanol de la fraction contenant le monophosphate est ensuite évaporé à sec au Rotavapor, puis le monophosphate est séparé par séchage sous vide partiel pendant 60 minutes. La solubilisation a été effectuée dans le volume nécessaire d'eau additionnée de 0.1 % de triéthylamine pour avoir une concentration cible de 2mg/ml et une sonication de la

solution finale 3 X 30 secondes dans un bain à ultrasons à une température de 60° C a été effectuée.

5 Suivi analytique des fractions par HPLC : après chaque étape, les fractions sont analysées par chromatographie analytique HPLC en phase inverse (Hewlett Packard HP1050, colonne Supelcosil LC-18,3  $\mu$ m, 4.6 X 150mm) au moyen d'un gradient linéaire allant de 75 % phase mobile A + 25 % phase mobile B à 100 % phase mobile B en 37.5 minutes à un débit de 1ml/min.

10 Phase mobile A : eau + acétonitrile à 5mM phosphate de tétrabutylammonium (1:1, v/v)

Phase mobile B : eau + isopropanol à 5mM phosphate de tétrabutylammonium (1:9,v/v)

15 A. Vérification de la pureté des produits par HPLC DP1 et DP2 = diphosphate : MP1 et MP2 = monophosphate

Diphosphate : le rendement de la purification est de 88 % (DP1) et 94 % (DP2). Après conversion en sel de sodium et resolubilisation, le rendement final est de 47 % (DP1) et de 57 % (DP2). La pureté des produits finaux est déterminée par l'intégration des surfaces à 210nm des pics HPLC.

20

Diphosphate	DP1	DP2
Quantité de produit initiale [mg]	17	35
Charge purifiée par HPLC C18 [mg]	15	33
Charge finale de la solution aqueuse [mg]	8	20
Pureté HPLC analytique LC18 à 210nm [%]	>99	>99
Temps de rétention [min]	20,0	20,0

25 Monophosphate : le rendement de la purification est de 59 % (MP1) et 76 % (MP2). Après conversion en sel de sodium et resolubilisation, le rendement final est de 43 % (MP1) et de 71 % (MP2). La pureté des produits finaux est déterminée par l'intégration des surfaces à 210nm, des pics HPLC.

Monophosphate	MP1	MP2
Quantité de produit initiale [mg]	42,3	34
Charge purifiée par HPLC C18 [mg]	25	26
Charge finale de la solution aqueuse [mg]	18	24
Pureté HPLC analytique LC18 à 210nm [%]	96.3	>99
Temps de rétention [min]	24,9	25,0

### B. Spectres de Masse

Le spectre de masse déterminé sur un appareil VG Quatro II à triple quadrupole en mode électrospray négatif a fourni les pics suivants :

Diphosphate : 3 pics essentiels 1012.8 [M-H]<sup>-</sup>, 1034.8 [M-2H + Na<sup>+</sup>]<sup>-</sup>, et le pic  
5 doublement chargé 506.0 [M-2H]<sup>2-</sup>.

Monophosphate : 2 pics essentiels 932.8 [M-H]<sup>-</sup> et 954.8 [M-2H + Na<sup>+</sup>]<sup>-</sup>,

En mode FAB + à résolution normale on observe une masse de 956.5 [M + Na<sup>+</sup>]  
En mode positif en matrice d'alcool 5-nitro benzylique la masse calculée pour le  
10 monophosphate est de 956.668 et la masse mesurée est de 956.667,  
correspondant à une formule C<sub>49</sub> H<sub>96</sub> O<sub>11</sub> N<sub>3</sub> Na P<sub>1</sub>.

La masse calculée pour le diphosphate est de 1 036.634 et la masse mesurée est  
de 1 036.635 ce qui correspond à une formule C<sub>49</sub> H<sub>97</sub> O<sub>14</sub> N<sub>3</sub> Na P<sub>2</sub>.

15

### Spectre RMN

Les spectres RMN ont été déterminés sur des produits avant purification par HPLC.

Pour le monophosphate comme pour le diphosphate on a déterminé le spectre  
20 RMN du proton [<sup>1</sup>H], du carbone -13 et du phosphore 31.

Les spectres obtenus attestant de l'identité et de la pureté des produits sont joints en annexe.

25

### V - ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES SELON L'INVENTION

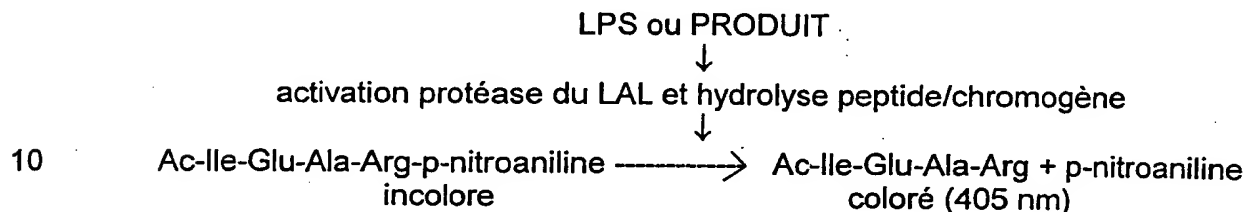
#### 1 - Détermination de l'endotoxicité par le test chromogénique au Limulus.

30

L'endotoxicité a été déterminée par le test Limulus Amoebocyte Lysate chromogénique (LAL-Chromogénique de Bio-Whittaker, kit n° 50-650U). Ce test est basé sur l'activation par le lipopolysaccharide (LPS) ou les produits de

structure comparable, d'une cascade enzymatique présente dans le LAL. Cette activation enzymatique est mise en évidence par le clivage d'un chromogène lié à un peptide par la protéase, en bout de chaîne de la cascade enzymatique selon la réaction suivante :

5



10

15

La réaction enzymatique est effectuée à 37° C et la formation du chromogène au cours du temps est mesurée à 405 nm. Dans cette méthode cinétique en point final, le temps nécessaire pour atteindre 0,2 unités de D.O. est enregistré et l'activité endotoxique calculée par rapport à un étalon de LPS (courbe standard).

20

Les résultats sont exprimés en EU (Endotoxin Unit) par rapport à une préparation standardisée de lipopolysaccharide de E-coli. Pour cette série de dosage 1 EU correspond à 0,08 mg d'équivalent LPS.

25

Les résultats présentent une variabilité relativement importante mais normale pour ce genre de dosage quantitatif qui donne surtout un ordre de grandeur. Le test LAL est surtout utilisé pour démontrer l'absence de pyrogène (limite supérieure de la concentration en endotoxine) dans des préparations pharmaceutiques. Le dosage quantitatif du contenu en pyrogène doit impérativement être comparé dans une même série d'expériences bien standardisées.

#### Résultats

30

Les résultats obtenus pour les produits de l'invention:

Produit	Résultats LAL chromogénique EU/mg (en duplicat chacun)	Moyenne EU/mg	Moyenne ng éq.LPS/mg produit
ester monophosphate	97 120	108 ± 16	8,6 ± 1,3
ester diphosphate	86 92 12 38	57 ± 39	4,6 ± 3,1

Les composés selon l'invention sont très peu pyrogéniques.

## 2 - Détermination de la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse de souris stimulées par du LPS ou par les composés de l'invention

### Expérience de prolifération :

Deux souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub> suivie d'une dislocation des cervicales. Les souris sont lavées à l'alcool, et la peau des membres postérieurs est retirée complètement. Les hanches, les fémurs et les tibias sont détachés au niveau des articulations. Les chairs sont enlevées grossièrement avec un scalpel. Les os sont nettoyés et les extrémités des os sont coupées aux ciseaux. La moelle est extraite de la lumière osseuse par injection en 3 fois de 1ml de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) par les extrémités qui ont été coupées aux ciseaux. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu DH et centrifugées pendant 5 minutes à 300 x g. Le surnageant est éliminé et les cellules souches sont remises en suspension dans du milieu DH complété avec 20 % de sérum foetal (FCS). La concentration cellulaire est ajustée à 500.000 cellules par ml.

Les produits en solution dans le milieu DH supplémenté avec le FCS, les acides aminés et les antibiotiques sont dilués en série directement dans la microplaque. 9 dilutions sont effectuées avec un facteur de 3,16. Les produits sont testés en sextuplicat et chaque microplaque comprend un contrôle négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100 µl. Les microplaques sont incubées pendant 1 heure à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité pour tamponner le milieu. Après 1 heure, 100 µl de la suspension cellulaire sont ajoutés aux produits et l'incubation est poursuivie pendant 7 jours.

La prolifération est déterminée par la mesure de l'oxydation d'un substrat chromogénique (XTT) dans les mitochondries des cellules vivantes.

Après 7 jours les microplaques sont centrifugées 5 minutes à 400 x g, et 100 µl de surnageant sont prélevés et éliminés. 50 µl d'une solution à 1 mg/ml de XTT 3-[1-phénylamino-carbonyl]-3,4-tétrazolium]-bis[(4-méthoxy-6-nitro)benzène sulfonate] de sodium et 0,008 mg/ml PMS ((N-méthyl dibenzopyrazine, méthyl sulfate) dans du milieu RPMI sont ajoutés à chaque puits. Après 8 heures d'incubation à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité, les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 492 nm contre une référence à 690 nm.

Les résultats sont exprimés en moyenne ( $\pm$  écart type) sous forme d'une courbe dose/réponse.

Les valeurs du contrôle négatif composé de milieu DH (moyenne  $\pm$  écart type de toutes les expériences) sont également indiquées sous forme graphique.

Dans cette expérience les composés selon l'invention induisent une prolifération significative des cellules-souches de moelle de souris, prolifération presque aussi importante que celle induite par le LPS de E. coli, mais avec un seuil d'activité (concentration minimale nécessaire pour induire une réponse significative) beaucoup plus faible. Le produit monophosphorylé induit une réponse plus faible que celle du produit diphosphorylé.

La figure 1 représente une expérience représentative tirée d'un ensemble de 3 expériences indépendantes obtenues à partir de préparations cellulaires différentes.

### **3- Détermination de la production d'oxyde nitrique dans les surnageants de macrophages**

#### Expérience de production d'oxyde nitrique :

Deux souris C57/BL6 mâles de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub> suivie d'une dislocation des cervicales. Les souris sont lavées à l'alcool, et la peau des membres postérieurs est retirée complètement. Les hanches, les fémurs et les tibias sont détachés au niveau des articulations. Les chairs sont enlevées grossièrement avec un scalpel. Les os sont nettoyés et les extrémités des os sont

coupées aux ciseaux. La moelle est extraite par injection en 3 fois de 1ml de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) dans la lumière osseuse. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu DH et centrifugées pendant 5 minutes à 300 x g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension à la concentration de 40000 cellules/ml dans du milieu DH complété avec 20 % de sérum de cheval (HS) et 30 % de surnageant de L929. Les L929 sont une lignée de fibroblastes murins dont le surnageant est riche en facteur de croissance pour les macrophages (M-CSF). La suspension cellulaire est dispensé par 12 ml dans des boîtes de Pétri qui sont incubées pendant 8 jours à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité. Après 8 jours, les cellules-souches se sont différenciées en macrophages matures. Les macrophages sont détachés par une incubation de 45 minutes à 4° C dans du PBS froid. Après centrifugation et élimination, les cellules sont remises en suspension dans du milieu DH complété avec 5 % de sérum foetal (FCS), de la glutamine, de l'asparagine, de l'arginine, de l'acide folique, du mercaptoéthanol et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules souches sont rassemblées et la concentration cellulaire est ajustée à 700.000 cellules par ml.

Les produits mis en solution dans le milieu DH supplémenté avec FCS, les acides aminés et les antibiotiques sont dilués en série directement dans la microplaque. 9 à 10 dilutions suivant les produits sont effectués avec un facteur de 3,16. Les produits sont testés en triplicat et chaque microplaque comprend un contrôle négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100 µl. Les microplaques sont incubées pendant 1 heure à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité pour tamponner le milieu. Après 1 heure, 100 µl de la suspension cellulaire sont ajoutés aux produits et l'incubation est poursuivie pendant 22 heures.

Après 22 heures les microplaques sont centrifugées, 5 minutes à 400 x g et 100 µl de surnageant sont prélevés et transférés dans une microplaque. 100 µl de réactif de Griess [5mg/ml de sulfanilamide + 0,5mg/ml de chlorhydrate de N-(1-naphthyléthylène diamine)] dans de l'acide phosphorique à 2,5 % aqueux, sont ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 562 nm contre une référence à 690 nm. La concentration en nitrite est proportionnelle

à celle de l'oxyde nitrique. La concentration en nitrite est déterminée par rapport à une courbe standard, linéaire de 1 à 25  $\mu$ M de nitrite.

Les résultats sont exprimés après soustraction du témoin négatif, en moyenne  $\pm$  écart type sous forme d'une courbe dose/réponse.

Dans cette expérience les composés selon l'invention induisent une production d'oxyde nitrique par les macrophages murins avec une courbe effet-dose. Le produit diphosphorylé induit une prolifération plus importante que celle induite par le LPS de E. coli, mais avec un seuil d'activité beaucoup plus faible. Le produit monophosphorylé induit une réponse plus faible que celle du produit diphosphorylé et que celle du LPS de E. coli. La figure 2 représente une expérience représentative tirée d'un ensemble de 3 expériences indépendantes obtenues à partir de préparations cellulaires différentes.

15

#### 4. Détermination de la capacité des composés selon l'invention à activer la production de TNF- $\alpha$ de macrophages alvéolaires humains.

Obtention des macrophages alvéolaires : Les macrophages alvéolaires humains ont été obtenus par lavage bronchoalvéolaire (BAL) de poumons de patients atteints de cancer du poumon. Le BAL est effectué immédiatement après chirurgie sur du tissu pulmonaire provenant des parties saines du lobe pulmonaire. Les lavages sont effectués avec NaCl 0,9 % à l'aide d'une seringue de 50ml. Les cellules obtenues sont constituées à >85 % de macrophages, les autres cellules étant principalement des lymphocytes. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension avec du milieu RPMI et les globules rouges sont éliminés par centrifugation sur Ficoll Paque (Research Grade). Les macrophages sont lavés 3 x avec HBSS et implantés dans des microplaques à 24 puits, à raison de 1ml par puits contenant un total de 1.000.000 de cellules. Après une heure d'incubation à 37° C, les macrophages sont adhérents et les puits sont lavés à 3 reprises avec 1ml de HBSS afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. Après les lavages, 1ml de RPMI est ajouté dans chacun des puits contenant les macrophages.

30



Incubation avec les produits et dosage du TNF- $\alpha$  : les macrophages alvéolaires sont incubés à 37° C et 5 % de CO<sub>2</sub> avec des concentrations de 0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml des produits suivants :

- 5 - contrôle négatif : RPMI
- contrôle positif : LPS de E.coli (serotype O5:B5, Difco, Detroit, U.S.A.)
- produit 1 : composé mono-phosphorylé selon l'invention
- produit 2 : composé diphosphorylé selon l'invention

Les surnageants des cultures sont récoltés après 24 heures et analysés pour leur teneur en TNF- $\alpha$  (Kit BioSource Cytoscreen, Camarillo, CA, U.S.A.) avec une limite de détection à 1 pg/ml.

#### Résultats :

- 15 Le dérivé monodiphosphorylé selon l'invention induit une production de TNF- $\alpha$  supérieure à celle du dérivé diphosphorylé. Le dérivé diphosphorylé induit une production de TNF- $\alpha$  non significative par rapport au contrôle négatif. Le contrôle positif LPS induit aux 3 concentrations testées une production élevée de TNF- $\alpha$ . Les résultats sont présentés dans le tableau I.

20

Tableau I

Produit	TNF- $\alpha$ [pg/ml]			
	moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences indépendantes			
	0 $\mu$ g/ml	0,1 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
contrôle négatif : RPMI	195 $\pm$ 70			
contrôle positif : LPS de E; coli		7667 $\pm$ 1155	9858 $\pm$ 2148	10390 $\pm$ 3415
produit 1 : MP lot 1		246 $\pm$ 38	353 $\pm$ 75	1049 $\pm$ 295
MP lot 2		205 $\pm$ 62	291 $\pm$ 70	1124 $\pm$ 406
produit 2 : DP lot 1		156 $\pm$ 66	117 $\pm$ 85	329 $\pm$ 141
DP lot 2		171 $\pm$ 79	88 $\pm$ 61	

**5. Détermination de la capacité des composés selon l'invention à inhiber la production de TNF- $\alpha$  de macrophages alvéolaires humains, induite par le lipopolysaccharide de E. coli (LPS)**

- 5 Obtention des macrophages alvéolaires : Les macrophages alvéolaires humains ont été obtenus par lavage bronchoalvéolaire (BAL) de poumons de patients atteints de cancer du poumon. Le BAL est effectué immédiatement après chirurgie sur du tissu pulmonaire provenant des parties saines du lobe pulmonaire. Les lavages sont effectués avec NaCl 0,9 % à l'aide d'une seringue de 50ml. Les cellules obtenues
- 10 sont constituées à >85 % de macrophages, les autres cellules étant principalement des lymphocytes. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension avec du milieu RPMI et les globules rouges sont éliminés par centrifugation sur Ficoll Paque (Research Grade). Les macrophages sont lavés 3 x avec HBSS et implantés
- 15 dans des microplaques à 24 puits, à raison de 1ml par puits contenant un total de 1.000.000 de cellules. Après une heure d'incubation à 37° C, les macrophages sont adhérents et les puits sont lavés à 3 reprises avec 1ml de HBSS afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. Après les lavages, 1ml de RPMI est ajouté dans chacun des puits contenant les macrophages.
- 20 Incubation avec les produits et dosage du TNF- $\alpha$  : les macrophages alvéolaires sont incubés à 37° C et 5 % de CO<sub>2</sub> avec du LPS d'E. coli (serotype O5: B5, Difco, Detroit, U.S.A.) à 1 $\mu$ g/ml additionné simultanément des produits suivants aux concentrations de 10 $\mu$ g/ml :
- contrôle négatif : RPMI
  - 25 - produit 1 : composé mono-phosphorylé selon l'invention
  - produit 2 : composé diphosphorylé selon l'invention

Les surnageants des cultures sont récoltés après 24 heures et analysés pour leur teneur en TNF- $\alpha$  (Kit BioSource Cytoscreen, Camarillo, CA, U.S.A.) avec une limite

30 de détection à 1pg/ml.

Résultats :

Le dérivé diphosphorylé inhibe de manière importante la production de  $\text{TNF-}\alpha$  normalement induite par le LPS. Le dérivé mono-phosphorylé inhibe partiellement la production de  $\text{TNF-}\alpha$  induite par le LPS.

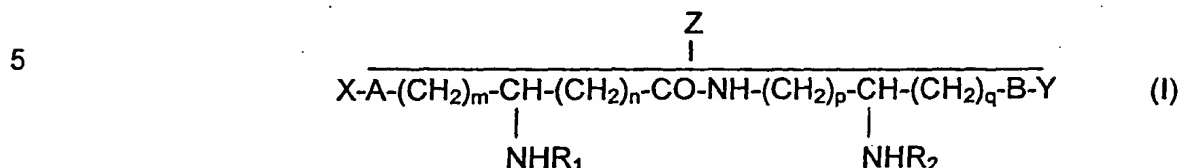
- 5 Les résultats sont présentés dans les figures 3 et 4 et dans le tableau II.

Tableau II

		Moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences indépendantes	
Produit	$\mu\text{g/ml}$	$\text{TNF-}\alpha$ [pg/ml]	% d'inhibition
contrôle négatif : RPMI	0	$195 \pm 70$	—
contrôle positif : LPS de E. coli	1	$9345 \pm 1435$	0
produit monophosphorylé lot 1 + LPS de E. coli	10 + 1	$5945 \pm 1109$	$68 \pm 19,5$
produit monophosphorylé lot 2 + LPS de E. coli	10 + 1	$5228 \pm 327$	$57 \pm 5$
produit diphosphorylé lot 1 + LPS de E. coli	10 + 1	$2218 \pm 484$	$24 \pm 5$
produit disphosphorylé lot 2 + LPS de E. coli	10 + 1	$1913 \pm 320$	$21 \pm 4$

## REVENDICATIONS

1. Pseudodipeptides N-acylés répondant à la formule générale I



dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en  $C_1$ - $C_{24}$ ) thio.

les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide choisi dans le groupe, formé d'un groupement

- carboxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$

-  $-\text{CH}[(\text{CH}_2)_m\text{COOH}] [(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]$  avec  $m = 0$  à 5 et  $n = 0$  à 5

- phosphono  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$

- dihydroxyphosphoryloxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$

- diméthoxyphosphoryl

- dihydroxyphosphoryle

- hydroxysulfonyl

- hydroxysulfonyl  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$

- hydroxysulfonyloxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$

sous forme neutre ou chargée,

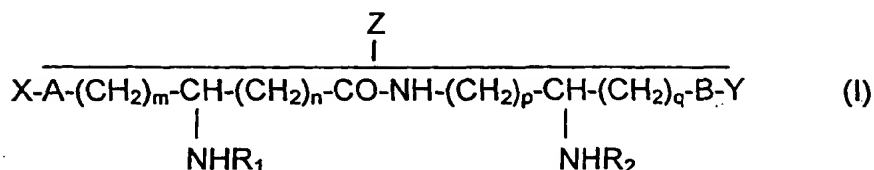
avec la limitation que l'un au moins des substituants X et Y représentent un groupe acide défini comme ci-dessus, sous forme neutre ou chargée,

A et B indépendamment l'un de l'autre représentent un atome d'oxygène, un atome de soufre ou le groupe imino  $-\text{NH}-$ .

et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un groupe Z. Le groupe Z est constitué d'un bras espaceur fonctionnalisé et pouvant être couplé, par une liaison covalente ou non-

covalente, à un antigène de nature protéinique, oligosaccharidique ou oligonucléotidique, à un glycoconjugué, ou à un composé portant un pharmacophore

- 5 2. Les sels des composés de formule générale I selon la revendication 1, lorsque X et/ou Y sont un groupe acide, salifiés avec une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible
- 10 3. Un 1 et/ou 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxy-tétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo 5-azadécane-1,10-diol et ses sels.
- 15 4. Un composé selon la revendication 1, ou la revendication 2, à savoir un 1,10-bis-(dihydrogénophosphate) de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels.
- 20 5. Un composé selon la revendication 1 ou la revendication 2, à savoir le 1,10-bis (dihydrogénophosphate) de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels.
- 25 6. Un composé selon la revendication 1, ou la revendication 2, à savoir un mono 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels.
- 30 7. Un composé selon la revendication 1, ou la revendication 2, à savoir un mono 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels.
8. Les composés de formule générale I selon la revendication 1, contenant des éléments de configuration R ou S, ou racémiques.
9. Un procédé d'obtention des pseudodipeptides de formule générale I selon la revendication 1



dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en  $C_1$ -  $C_{24}$ ) thio, dans laquelle l'un au moins des substituants de  $R_1$  ou  $R_2$  est un groupe acyloxyacyle

les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

$X$  et  $Y$  représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide choisi dans le groupe constitué par

- carboxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$
- $-\text{CH}-[(CH_2)_m\text{COOH}] [(CH_2)_n\text{COOH}]$  avec  $m = 0$  à 5 et  $n = 0$  à 5
- phosphono  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$
- dihydroxyphosphoryloxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$
- diméthoxyphosphoryl
- hydroxysulfonyl
- hydroxysulfonyl  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$
- hydroxysulfonyloxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyl}]$
- dihydroxyphosphoryl

sous forme neutre ou chargée,

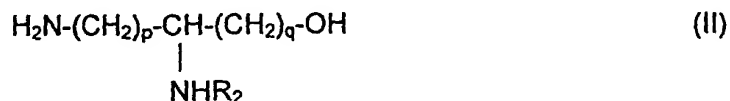
avec la limitation que l'un au moins des substituants  $X$  et  $Y$  représente un groupe acide défini comme ci-dessus, sous forme neutre ou chargée,

$A$  et  $B$  ont les significations fournies antérieurement, et l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un groupe  $Z$  défini comme ci-dessus

caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en  $(q+1)$  et en  $\omega$  de l'acide diaminé de formule  $H_2N(CH_2)_pCHNH_2(CH_2)_{q-1}COOH$  par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former

l'alcool correspondant, libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $R_2$  OH dans laquelle  $R_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir une diamine de formule générale II

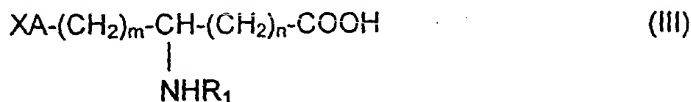
5



10 dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus, p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

15 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d'un  $\omega$ -hydroxy, amino ou thio amino acide de formule générale III

20



25

dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment m est un nombre entier variant de 1 à 10

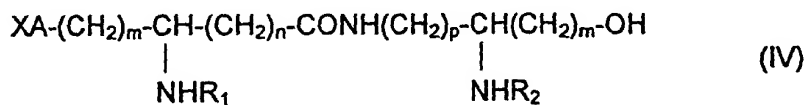
n est un nombre entier variant de 0 à 10

A est de l'oxygène, du soufre ou un groupe imino NH

30

et X est un radical acide défini comme précédemment présent éventuellement sous forme estérifiée pour former le pseudodipeptide de formule générale IV

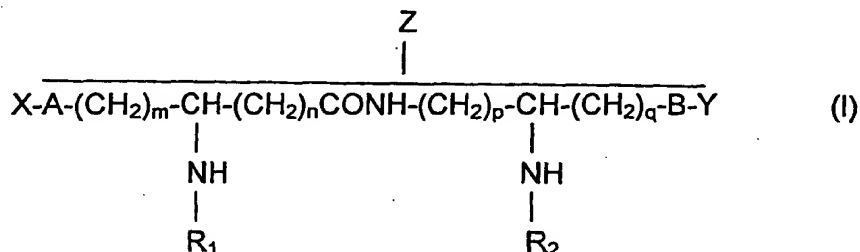
35



dans laquelle les substituants et les descripteurs  $R_1$ ,  $R_2$ , m, n, p et q sont définis comme précédemment, dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou

acyler la fonction alcool par un réactif approprié, en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une hydrogénation catalytique ou à une autre méthode de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I

5



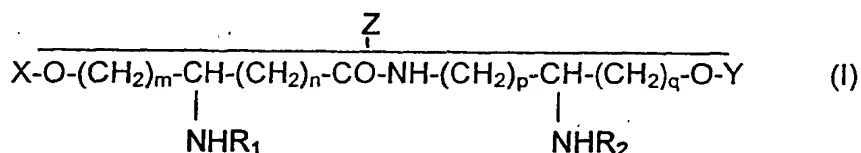
10

dans laquelle les substituants et les descripteurs A, B, X, Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, n, m, p et q ont les significations fournies antérieurement et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un bras espaceur fonctionnalisé Z.

15

10. Un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale I

20



25

dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe dihydroxyphosphoryle sous forme neutre ou chargée,

30

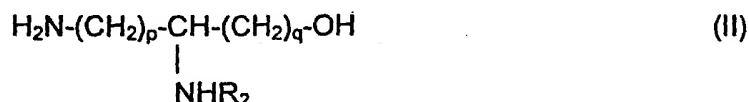
et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un bras espaceur fonctionnalisé

35

caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en (q+1) et en ω du diamino acide de formule H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q-1</sub>COOH par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction

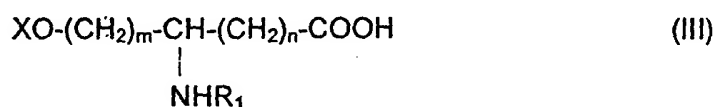


carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $R_2$  OH dans laquelle  $R_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II



dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus, p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d' $\omega$ -hydroxy amino acide de formule générale III



dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants

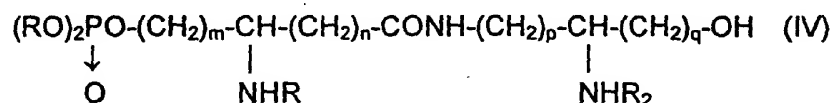
m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

et X est un radical diaryloxyphosphoryle de formule  $(\text{RO})_2 \text{P}$

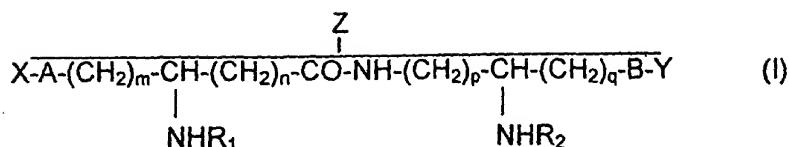


pour former le pseudodipeptide de formule générale IV



dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$ , m, n, p et q sont définis comme précédemment, et R est un radical labile par hydrogénolyse, dont on peut -si désiré- phosphoryler la fonction alcool par un agent de phosphorylation en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une hydrogénation catalytique en deux étapes pour débloquer la fonction alcool





5 dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en  $C_1 - C_{24}$ ) thio

10 les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10 le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

X et/ou Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide sous forme neutre ou chargée

A et B semblables ou différents l'un de l'autre, sont de l'oxygène, du soufre ou

15 un groupe imino

et dans laquelle l'un des atomes d'hydrogène du pseudodipeptide peut être remplacé par un groupe Z, le groupe Z étant constitué d'un bras espaceur fonctionnalisé et pouvant être couplé, par une liaison covalente ou non-covalente, à un antigène de nature protéinique, oligosaccharidique ou

20 oligonucléotidique, à un glycoconjugué, ou à un composé portant un pharmacophore

en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

25 17. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 16, dans lesquelles le composé de formule I est un de ceux pour lesquels X et/ou Y représentent un radical dihydroxyphosphoryle et A et B représentent de l'oxygène.

30 18. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17 dans lesquelles le principe actif est sous forme salifiée avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.

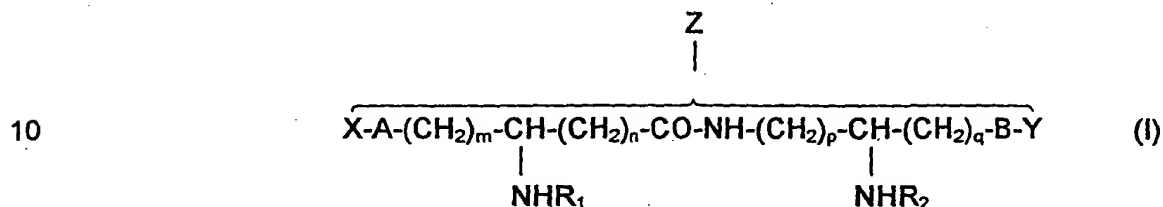
35 19. Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications 16 à 18, dans lesquelles le principe actif est sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères.

## RESUME

L'invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement à celui de la chimie thérapeutique.

5

Elle a pour objet des pseudodipeptides N-acylés répondant à la formule générale I



15 dans laquelle les substituants Z, A, B, X, Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, n, m p et q ont les définitions fournies dans les revendications.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I sous forme acide ou salifiée.

20

Les composés selon l'invention manifestent des propriétés intéressantes dans le domaine de l'immunologie qui les rendent utiles comme médicaments.

FIGURE 1

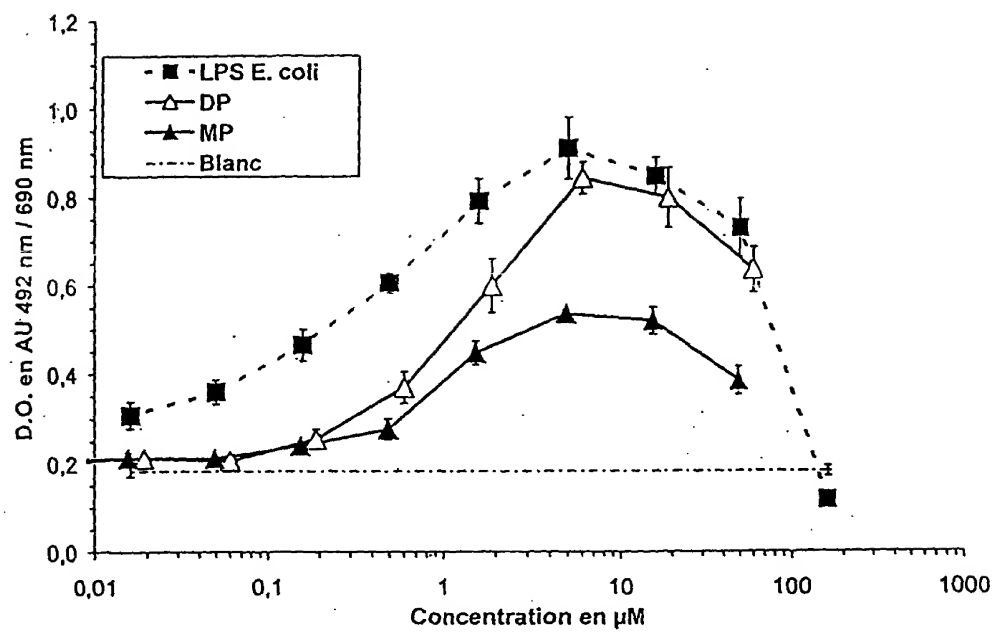
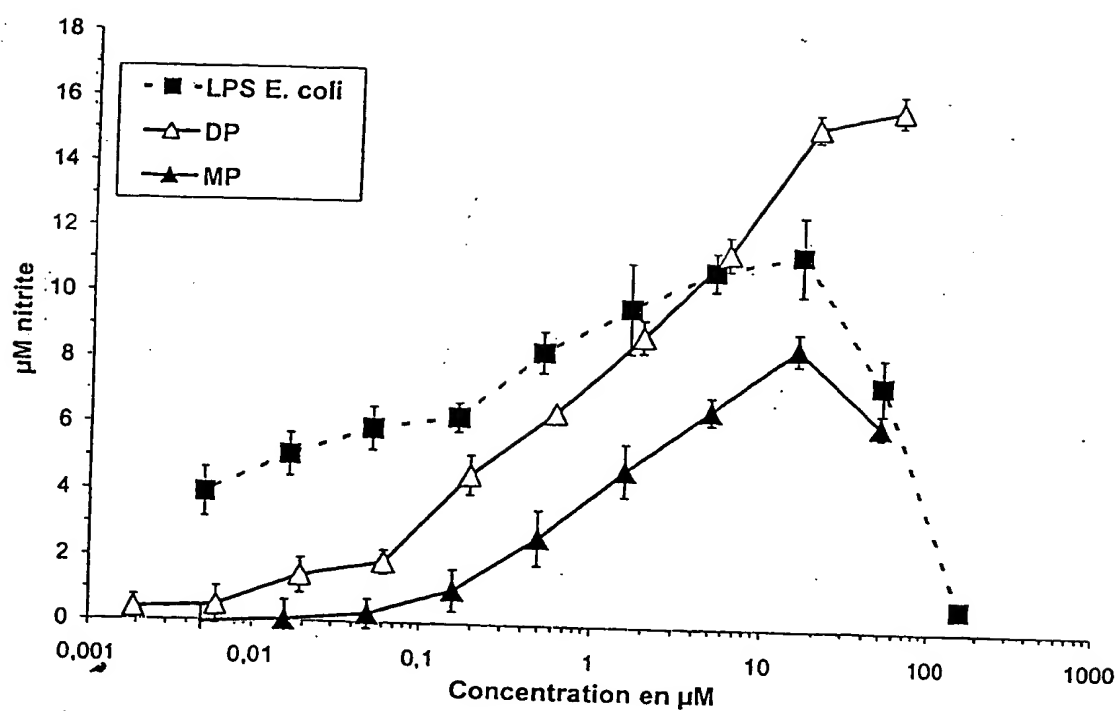
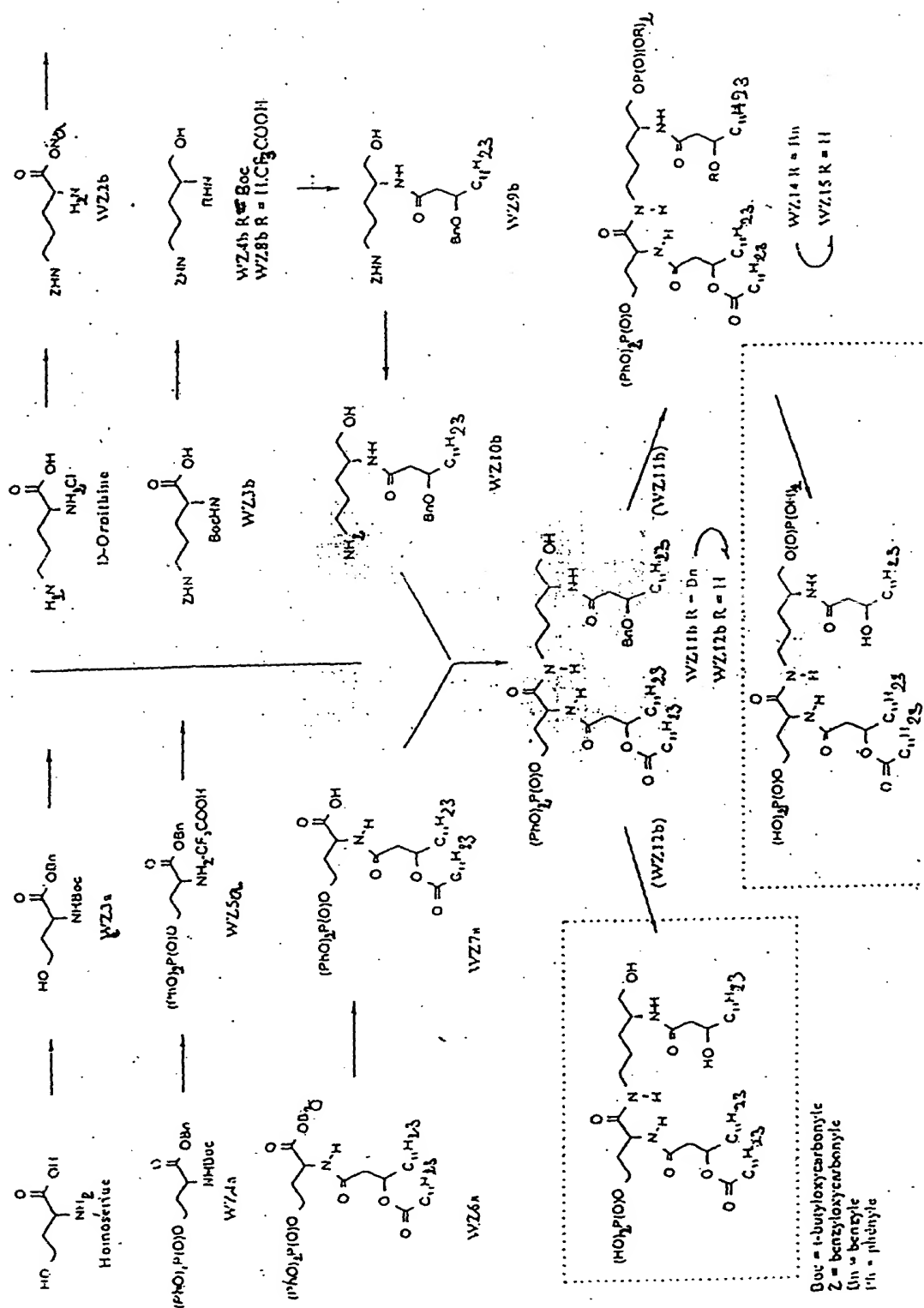


FIGURE 2

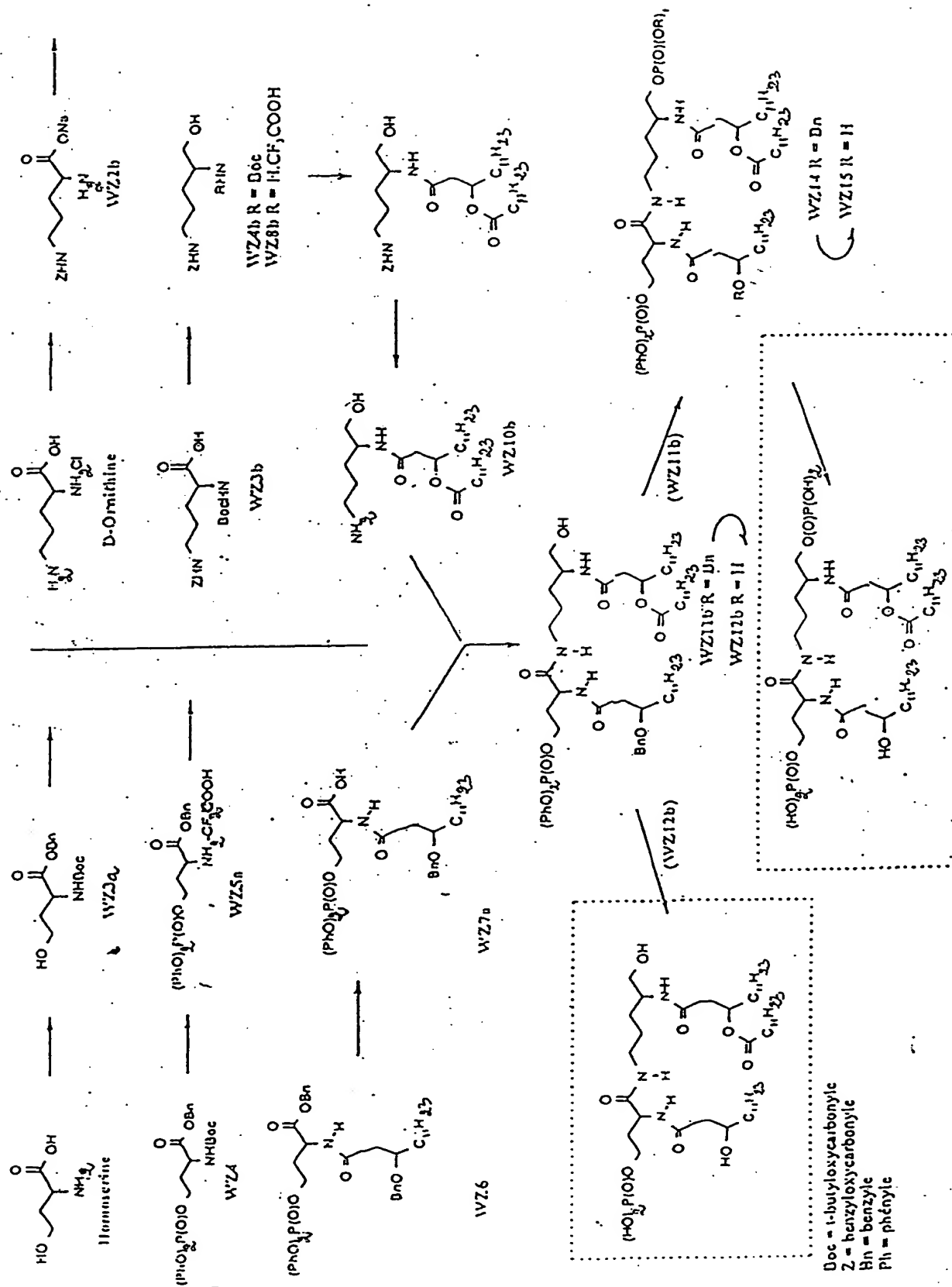


SCHEMA DE SYNTHÈSE I



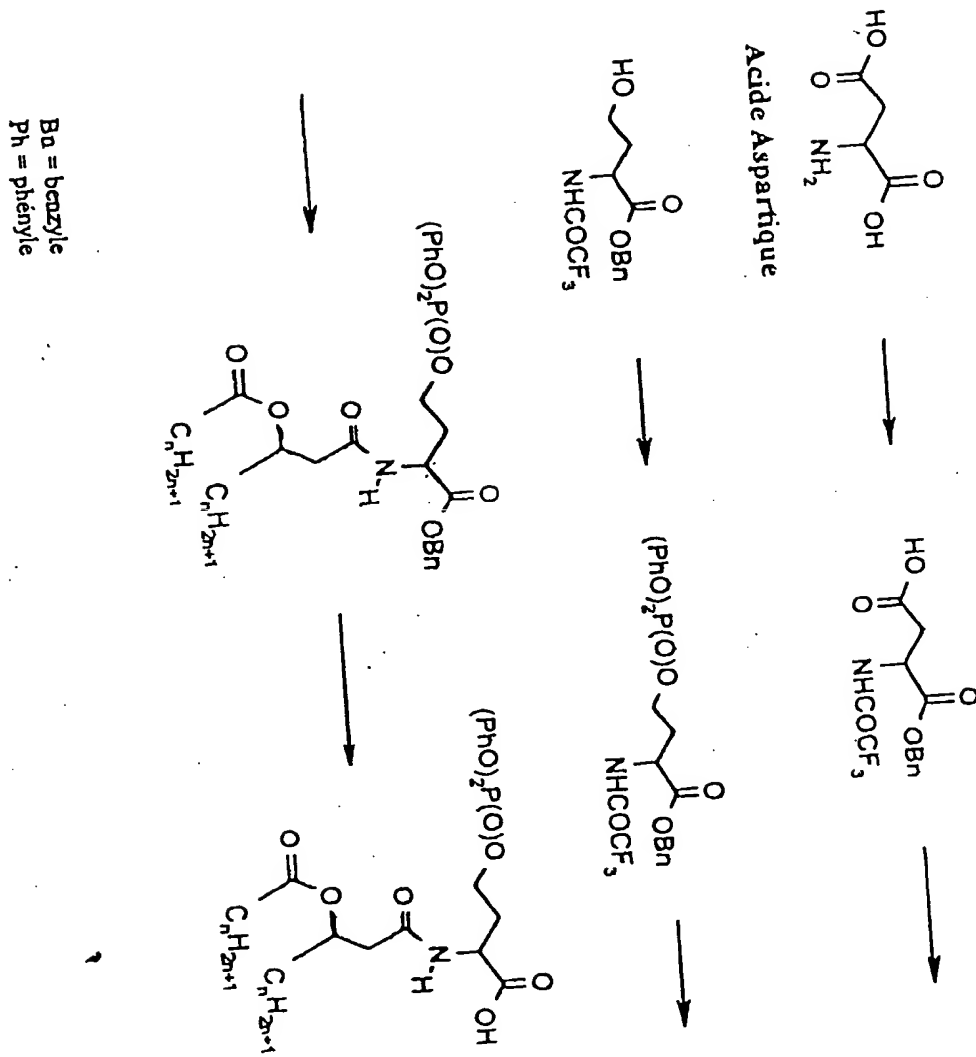
4/15

SCHEMA DE SYNTHESE II

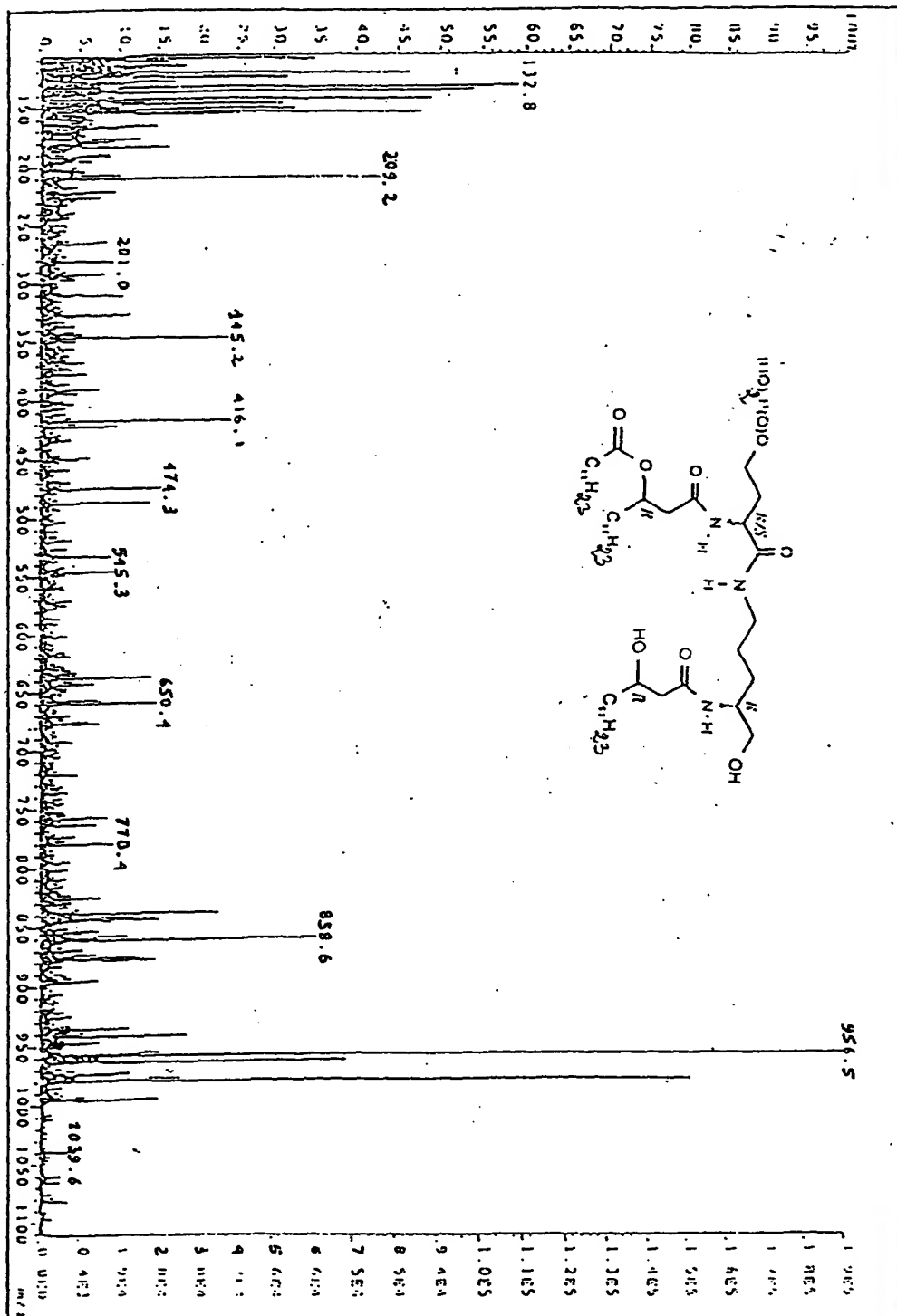




# SCHEMA DE SYNTHÈSE III

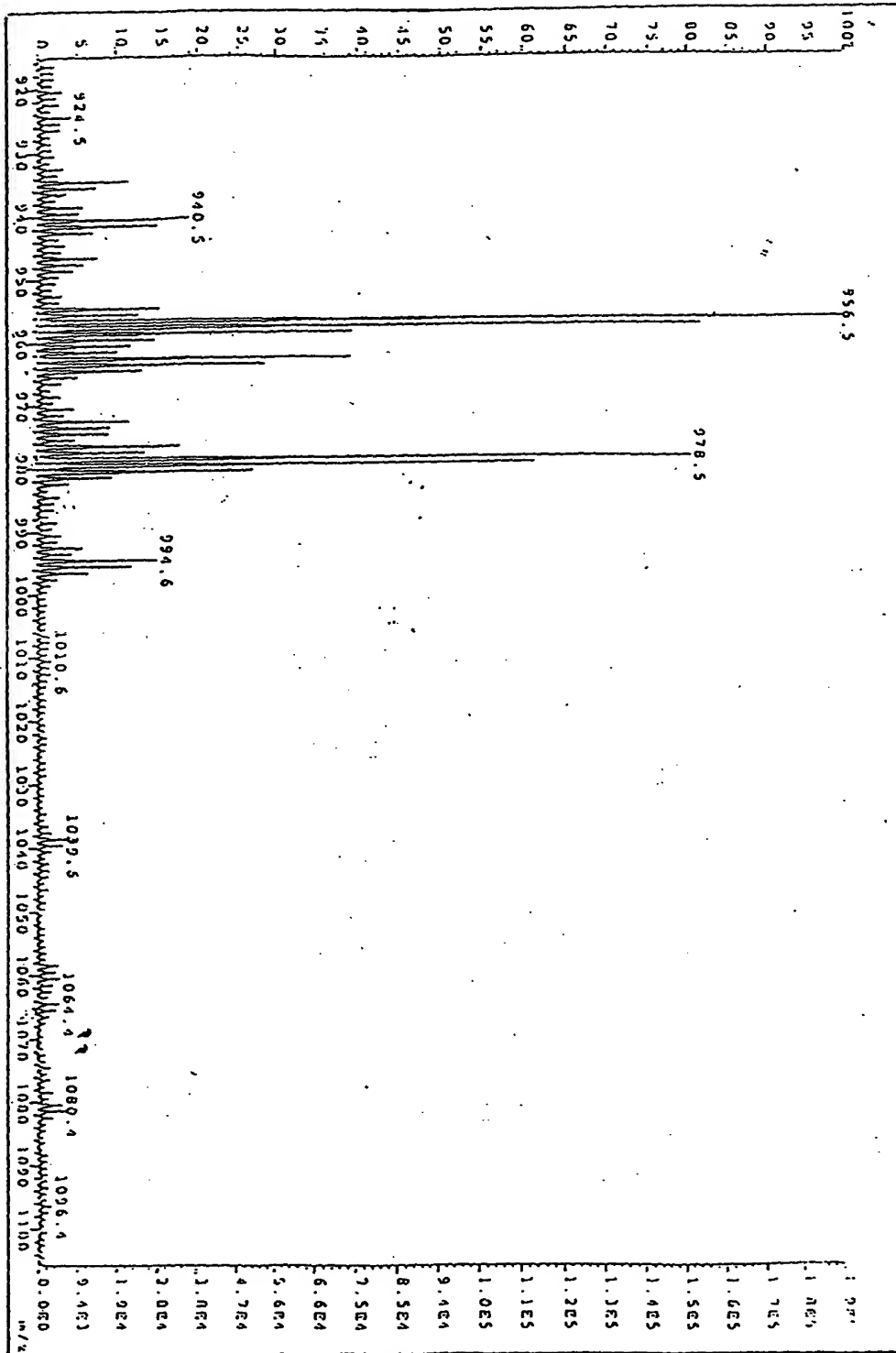


## SPECTRE DE MASSE-MONOPHOSPHATE (A)

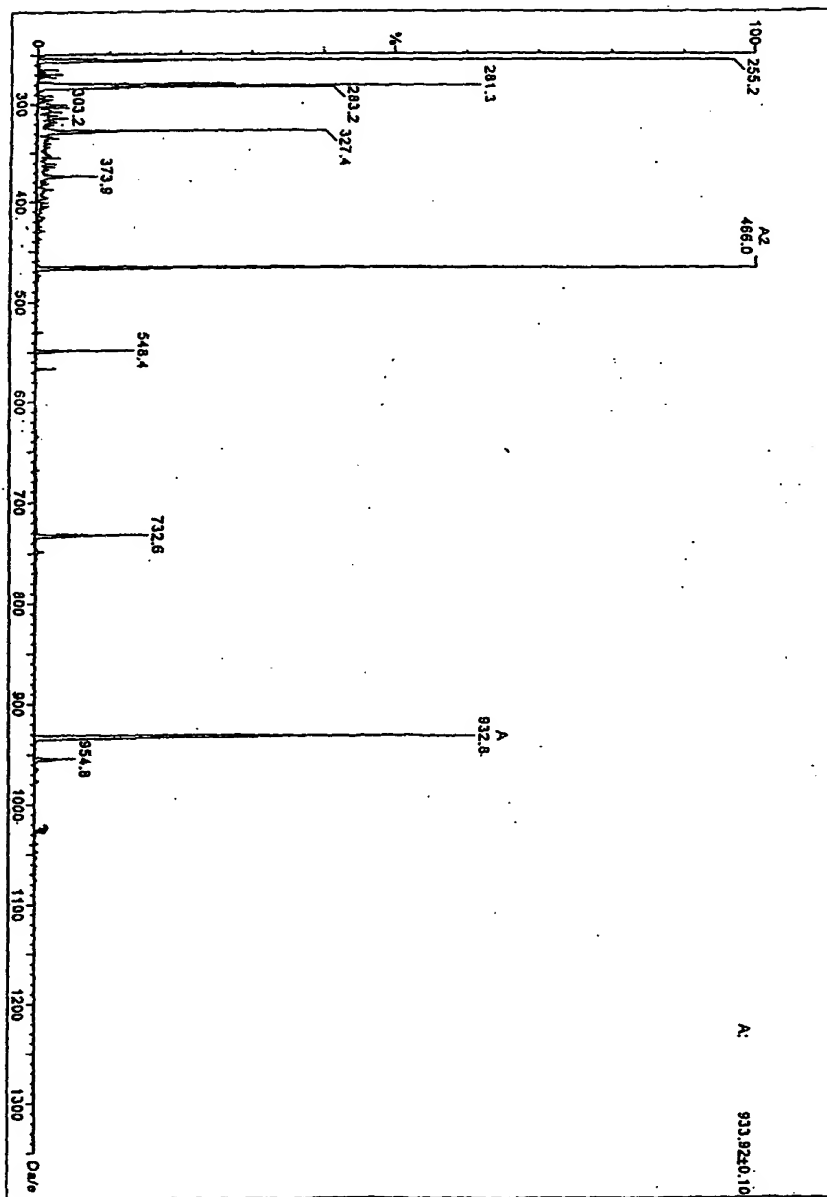


7/15

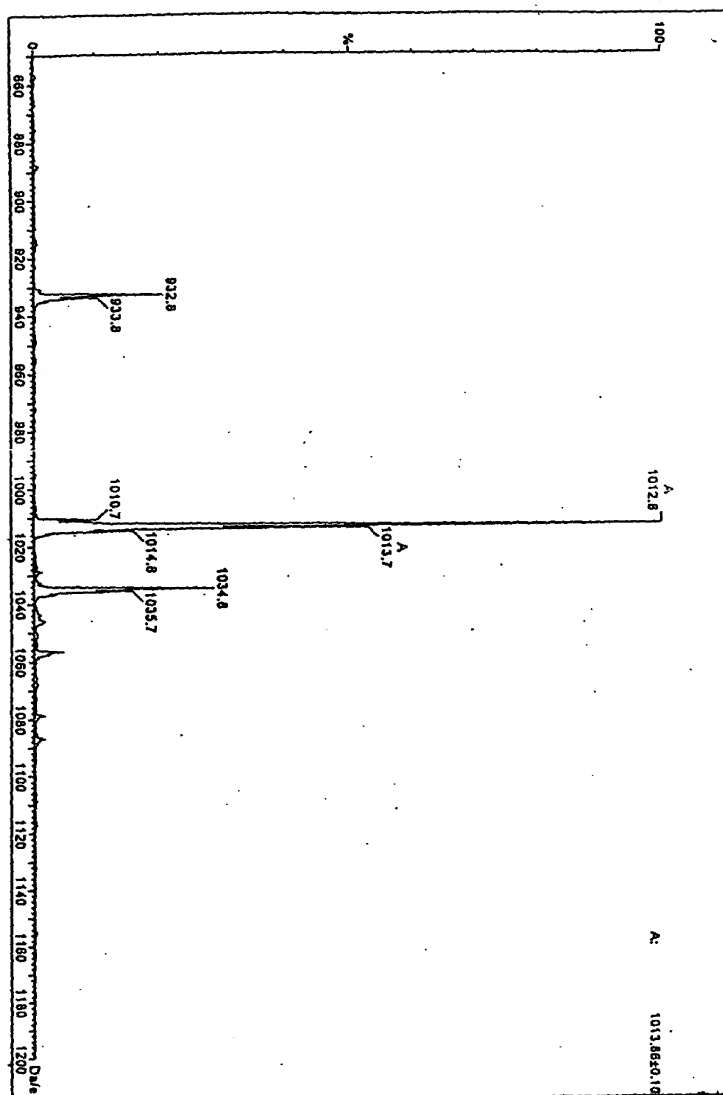
## SPECTRE DE MASSE-MONOPHOSPHATE (B)



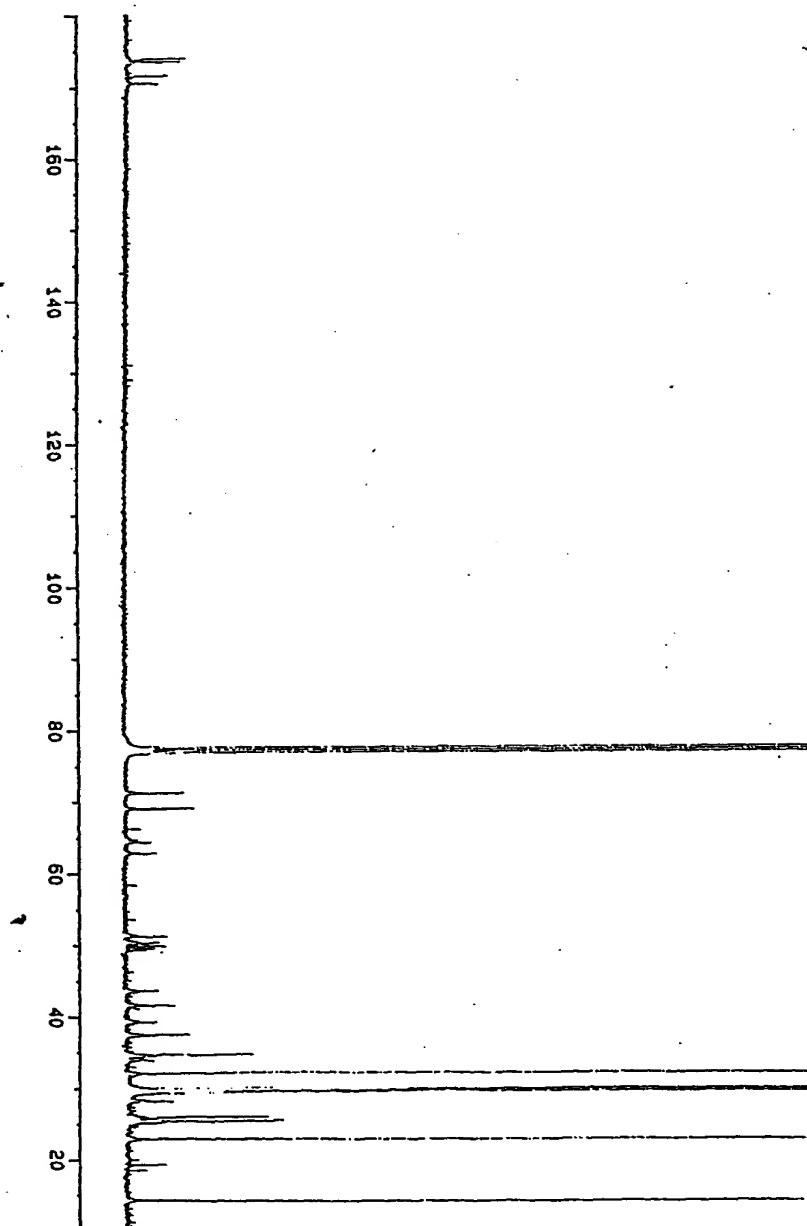
SPECTRE DE MASSE-DIPHOSPHATE (A)



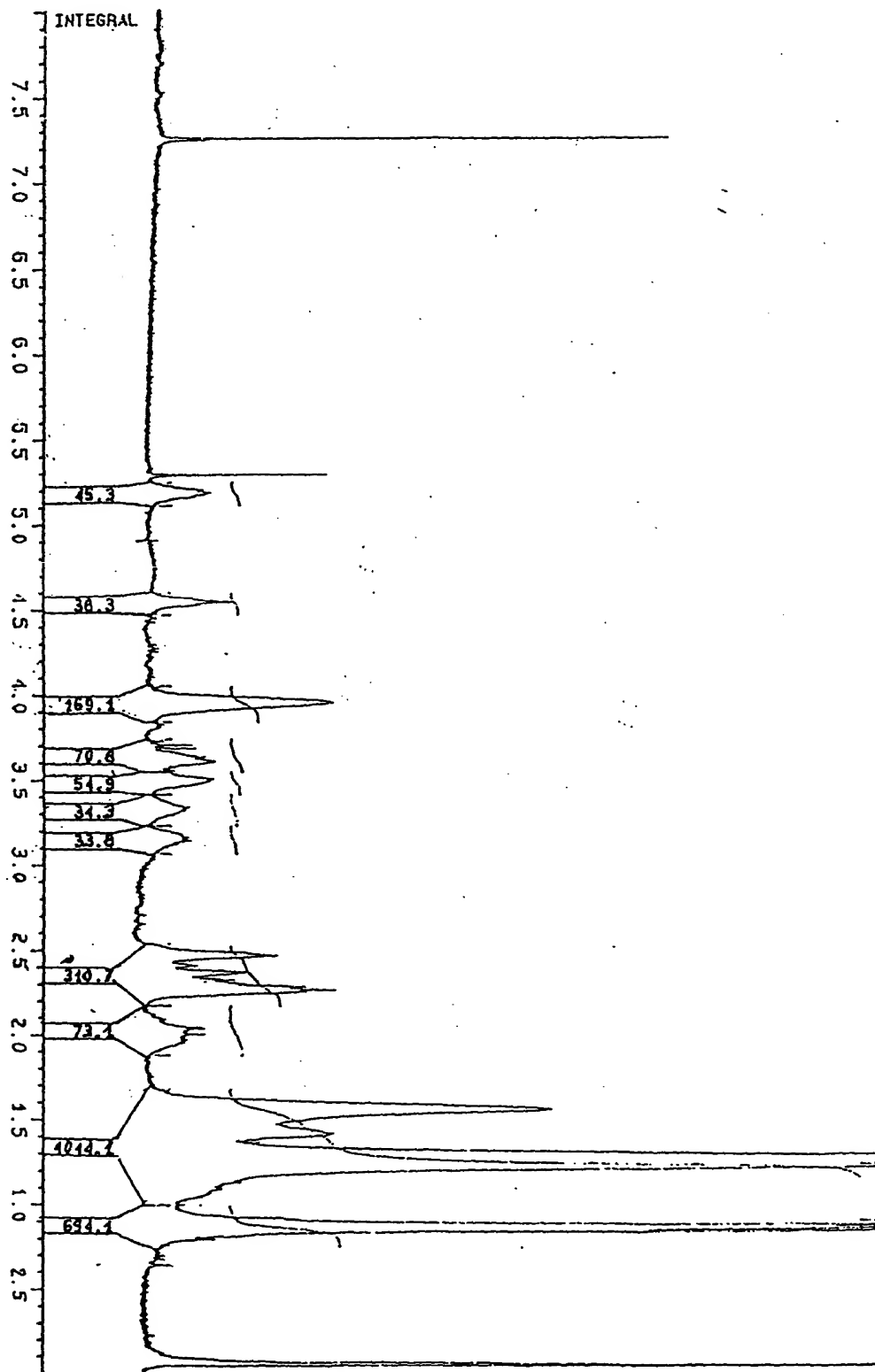
SPECTRE DE MASSE-DIPHOSPHATE (B)



MONOPHOSPHATE: 13C-RMN

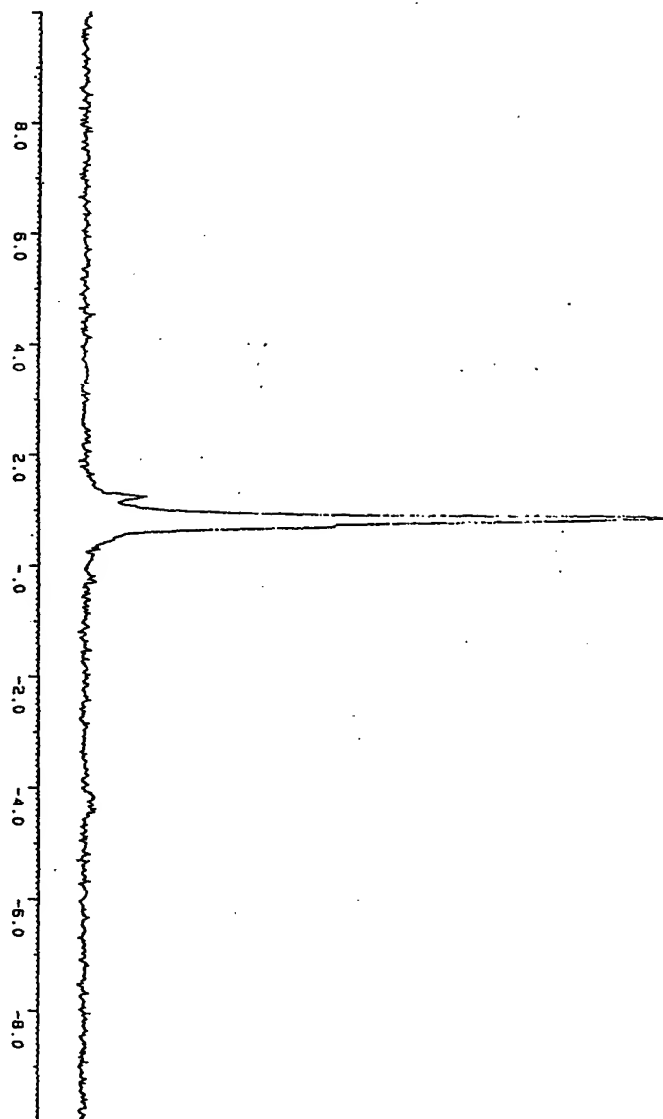


MONOPHOSPHATE: 1H-RMN



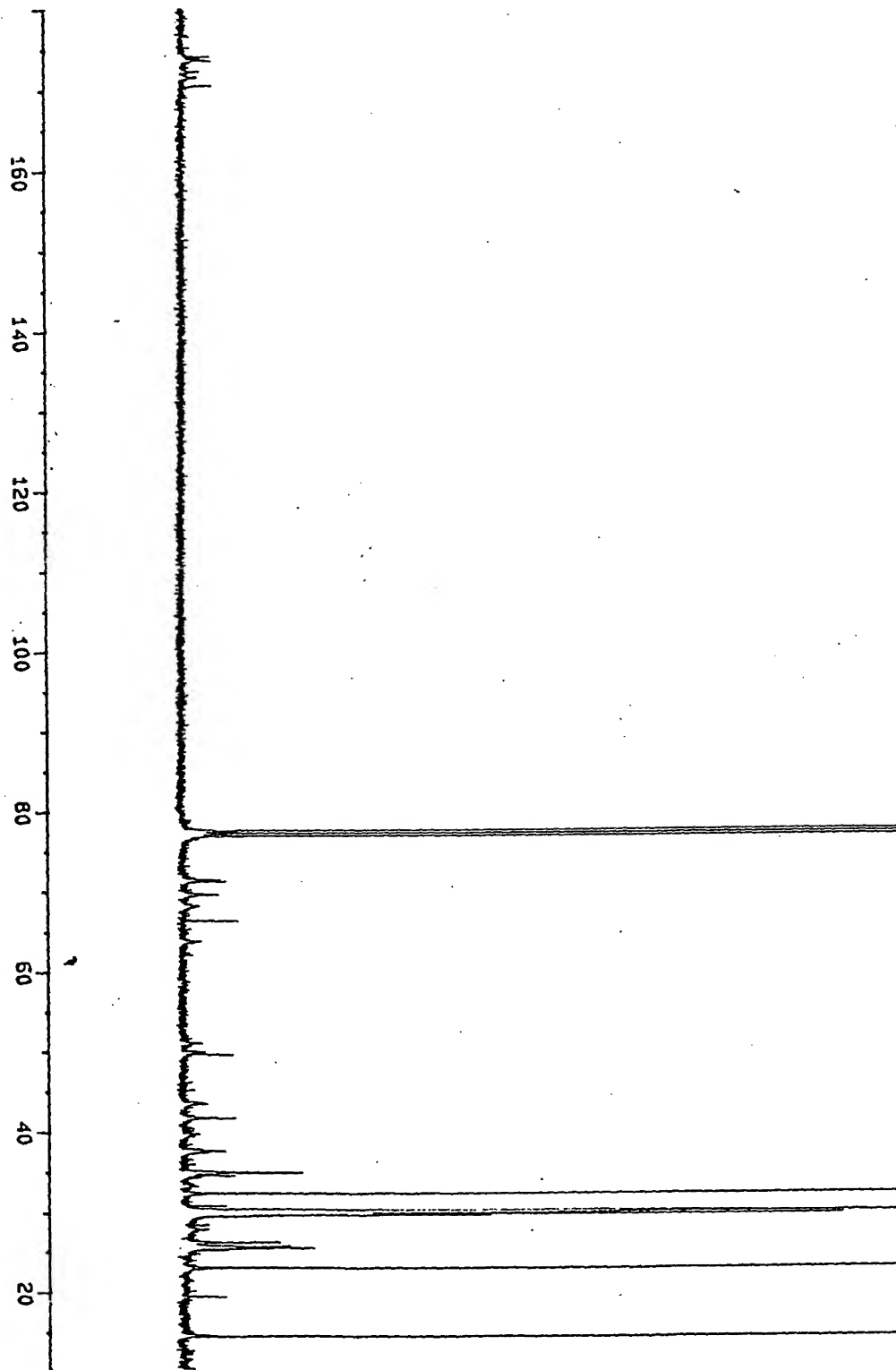
12/15

MONOPHOSPHATE: 31P-RMN

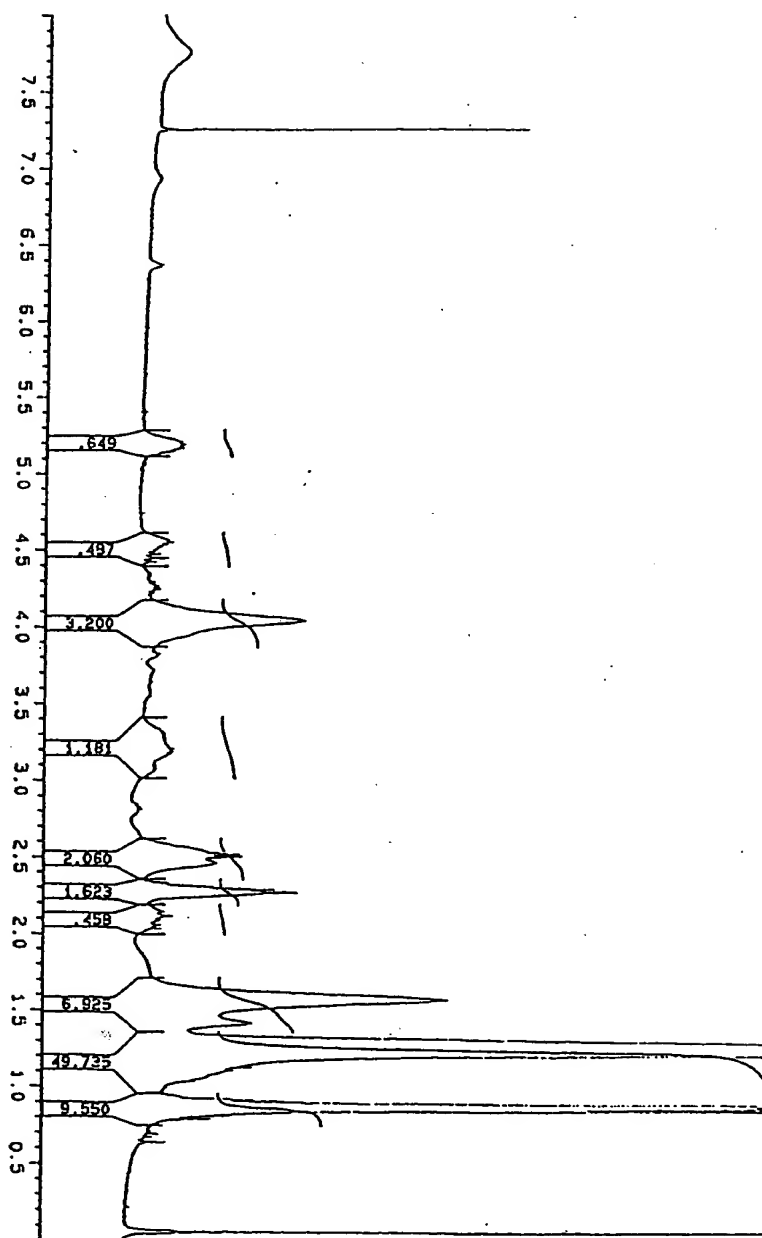




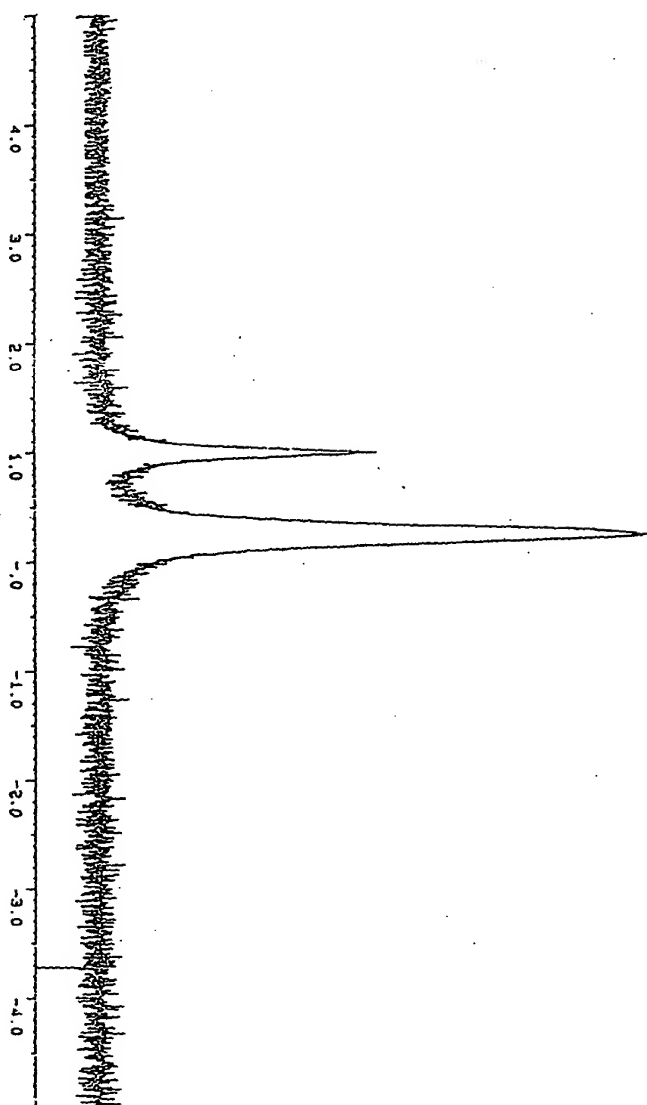
DIPHOSPHATE:  $^{13}\text{C}$ -RMN



DIPHOSPHATE: 1H-RMN

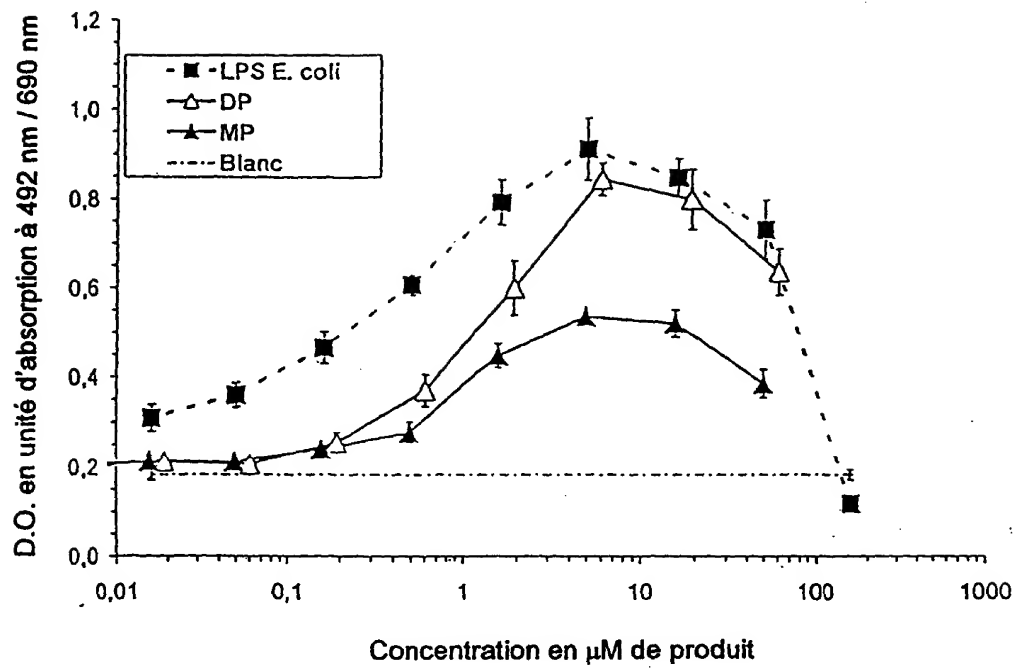


DIPHOSPHATE: 31P-RMN



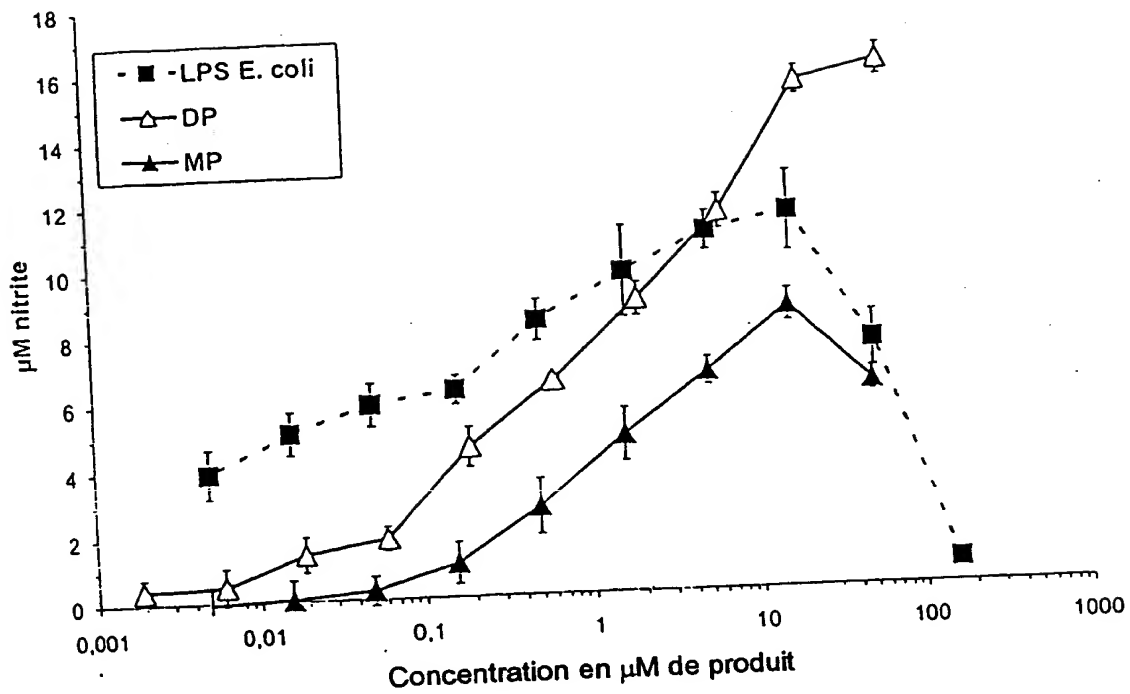
1/15

FIGURE 1



2/15

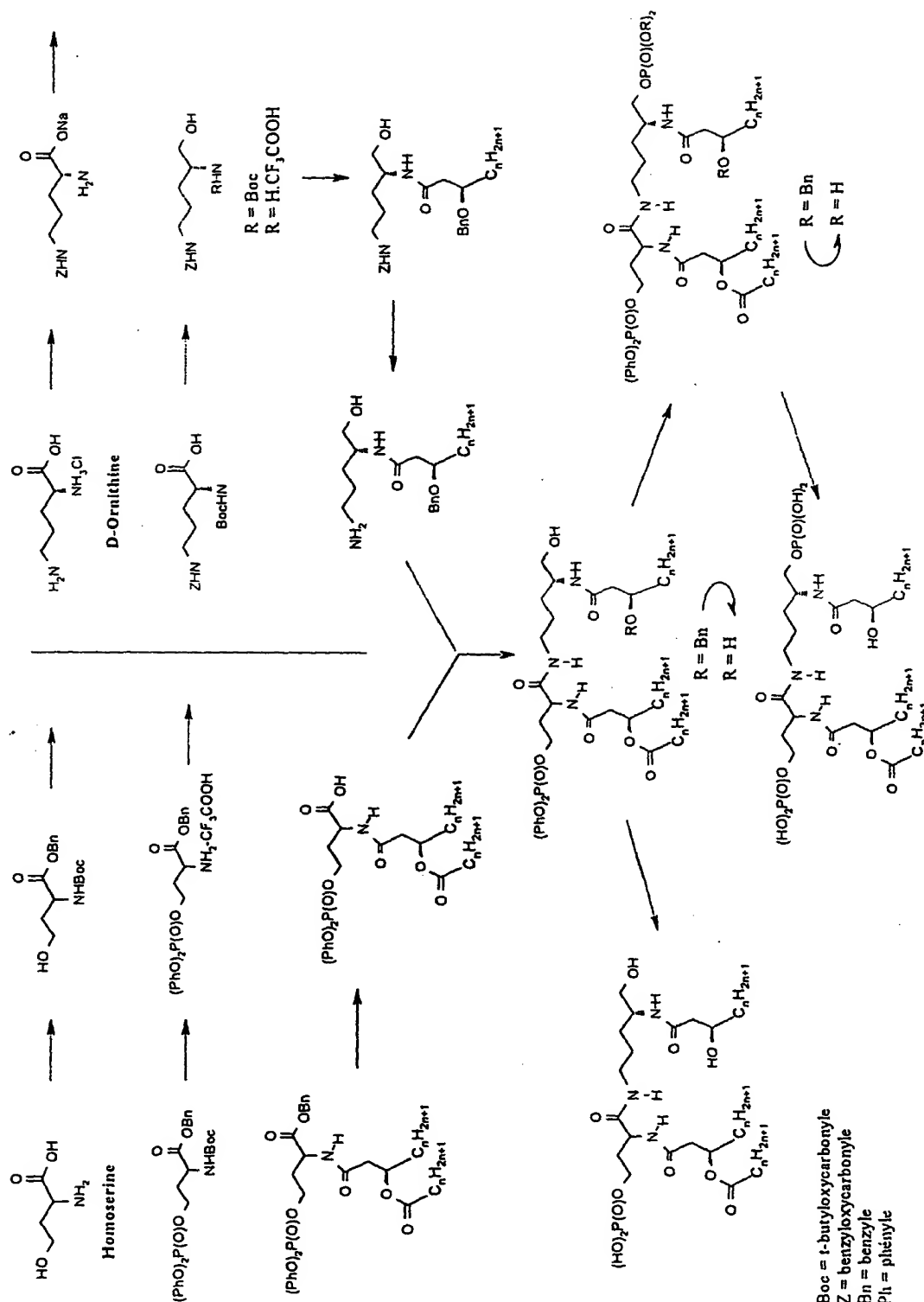
FIGURE 2



3/15

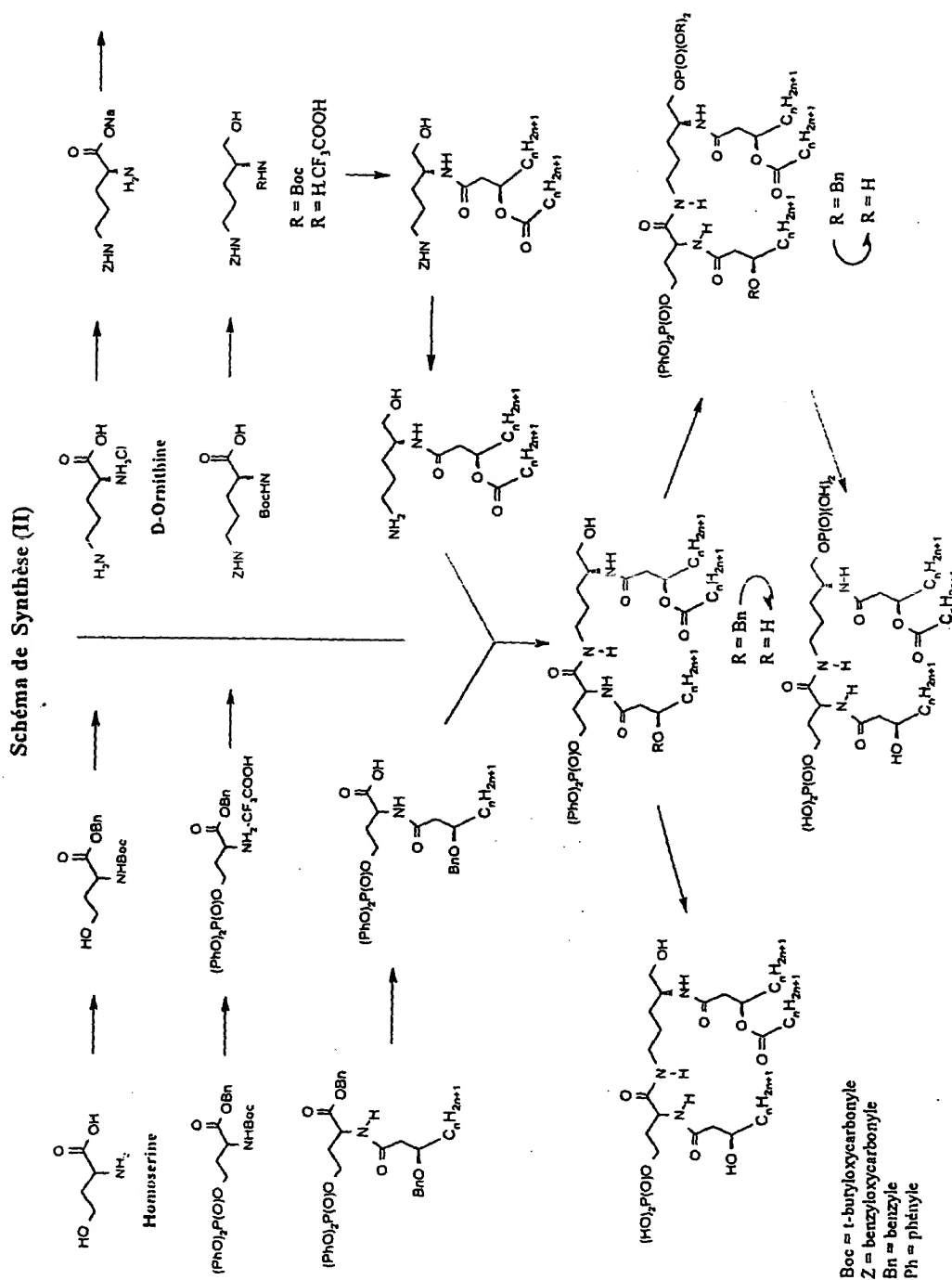
FIGURE 3

## Schéma de Synthèse (I)



4/15

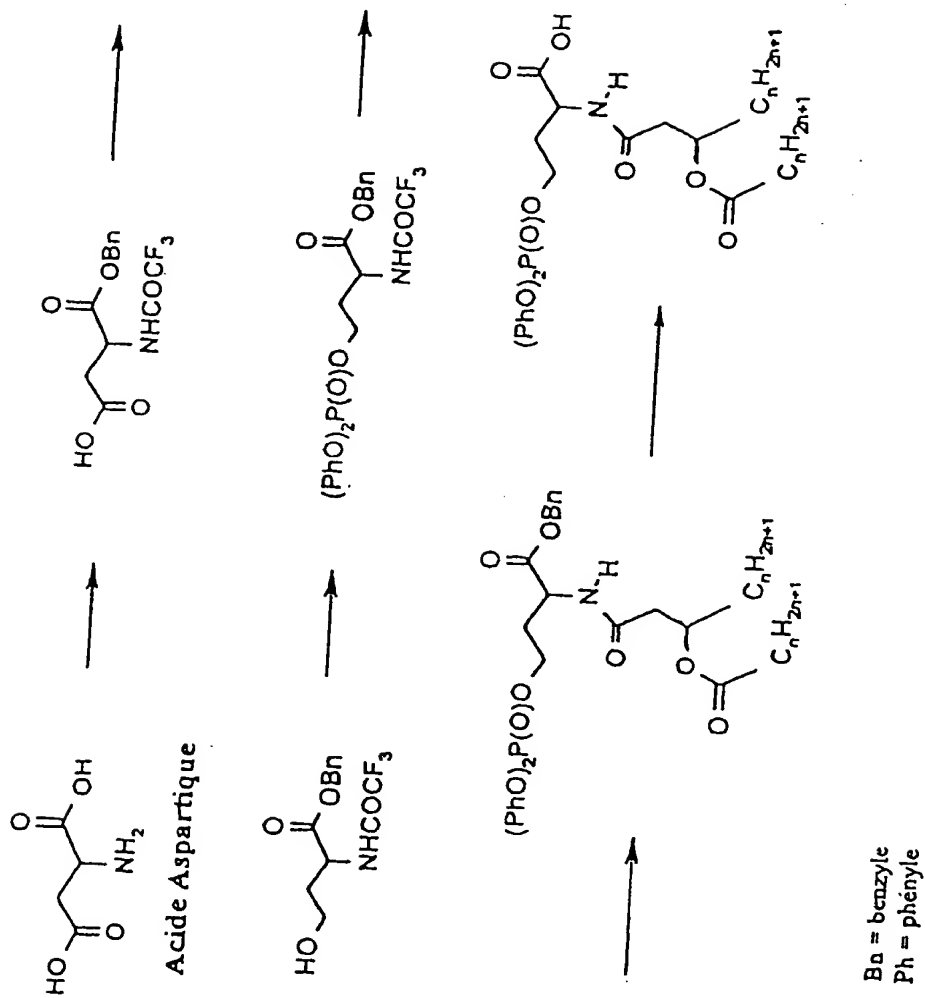
FIGURE 4



5/15

FIGURE 5

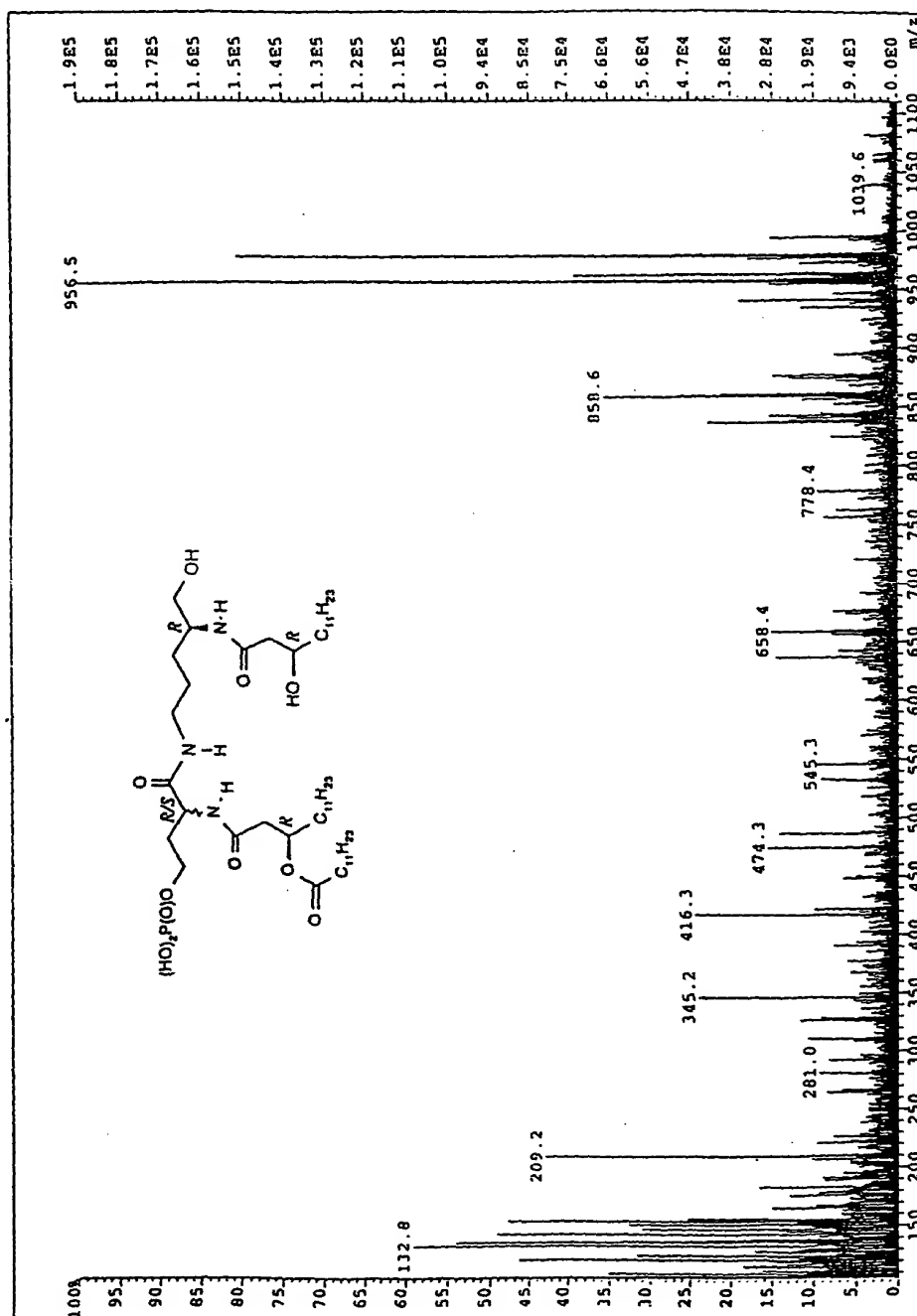
SCHEMA DE SYNTHÈSE III





**FIGURE 6**

**SPECTRE DE MASSE-MONOPHOSPHATE (A)**



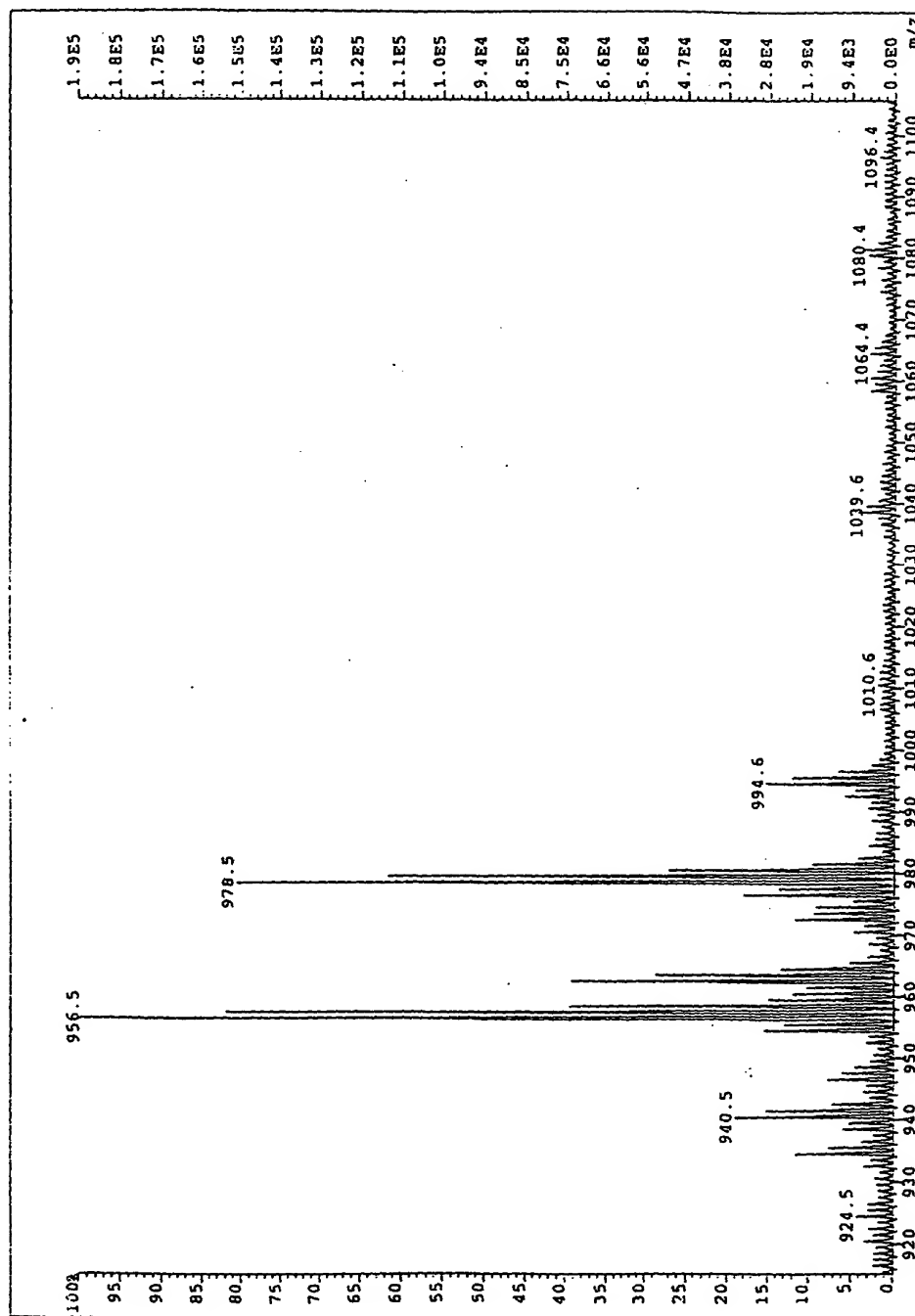
POT/FR98/0139

08 OCT. 1998

7/15

FIGURE 7

SPECTRE DE MASSE-MONOPHOSPHATE (B)

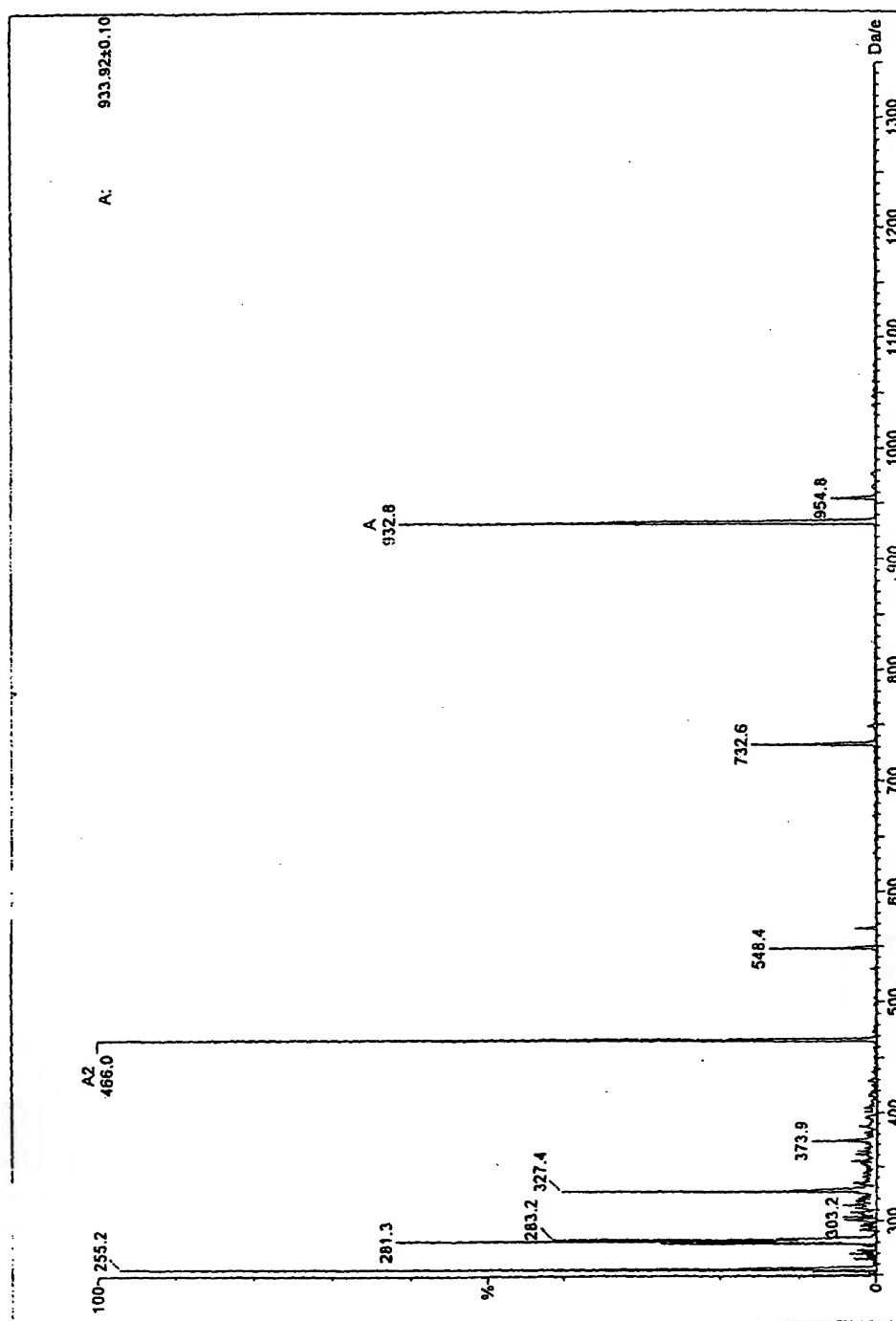


08 OCT. 1998

8/15

FIGURE 8

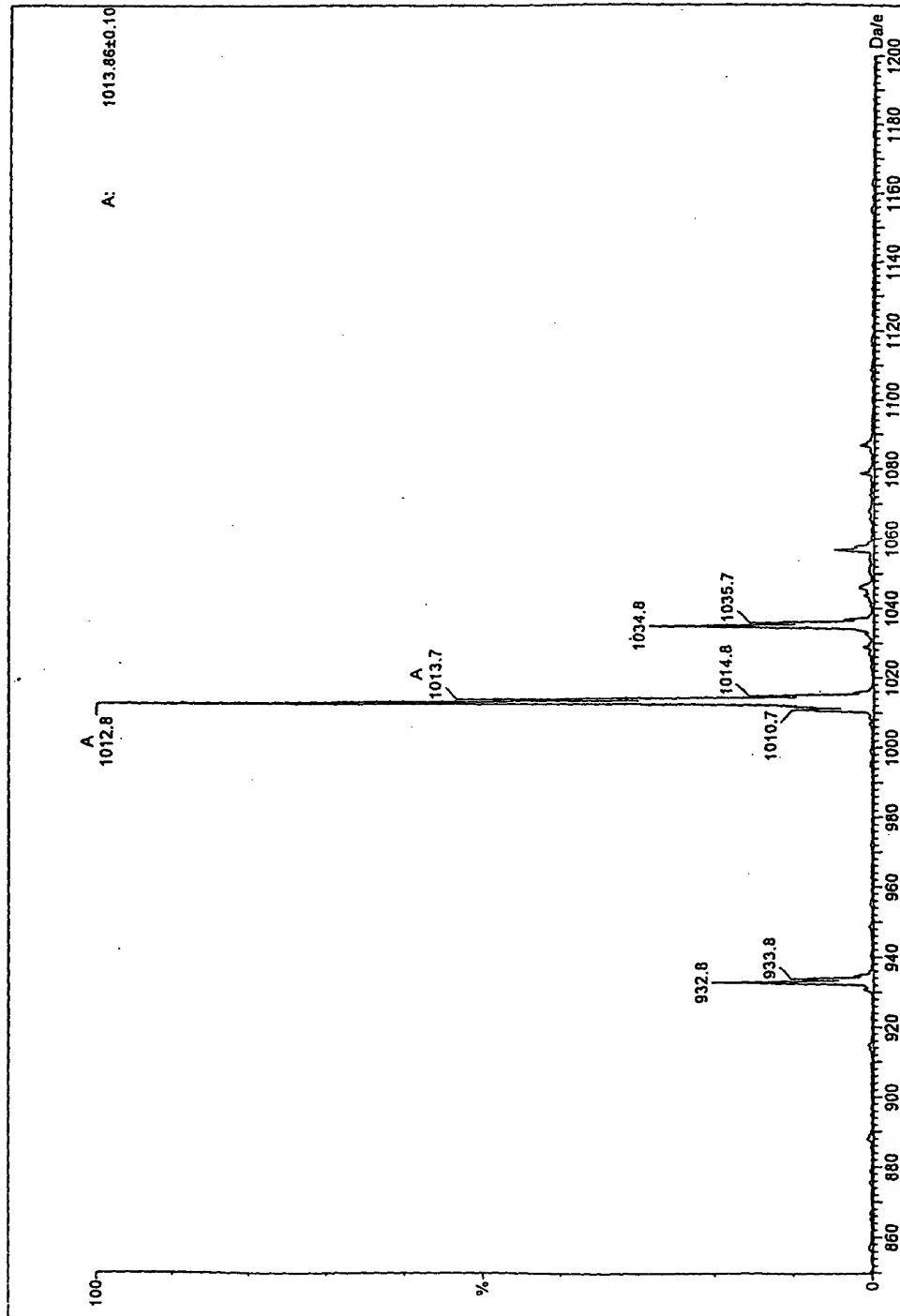
## SPECTRE DE MASSE-DIPHOSPHATE (A)



9/15

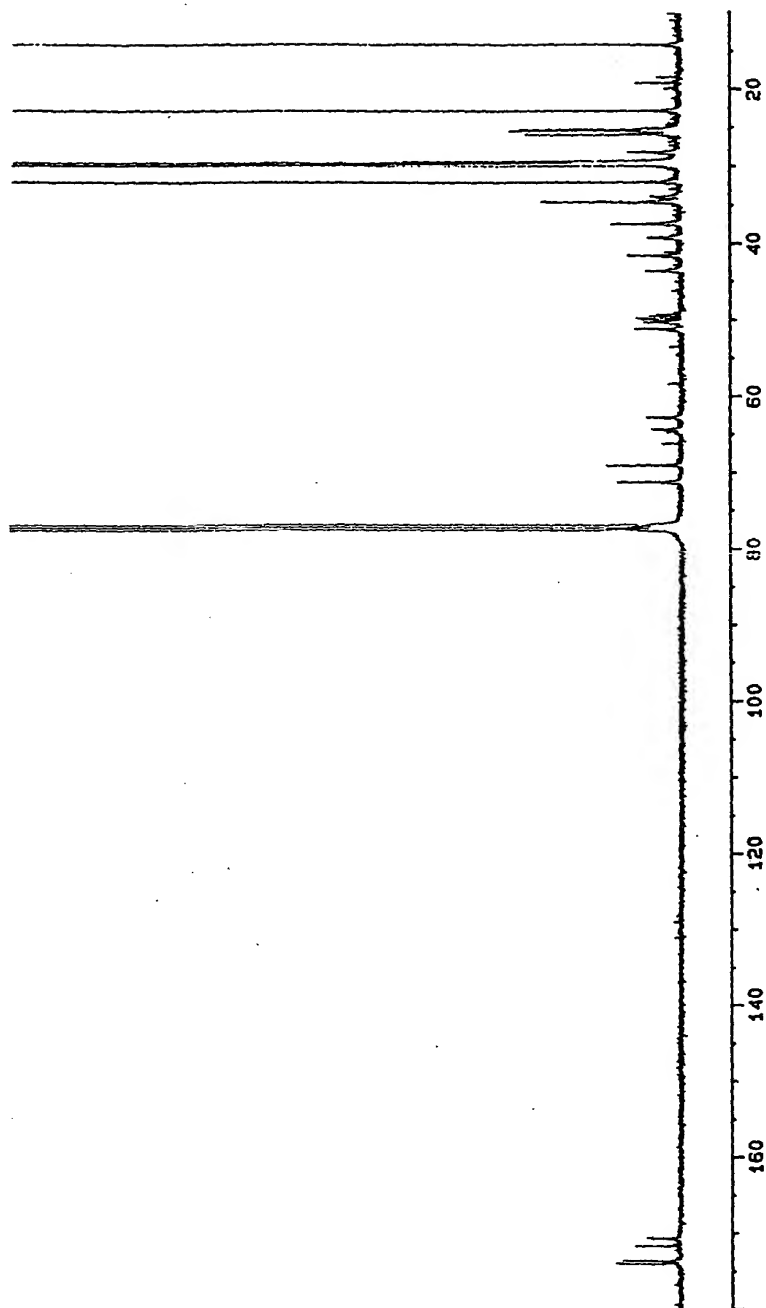
FIGURE 9

SPECTRE DE MASSE-DIPHOSPHATE (B)



10/15

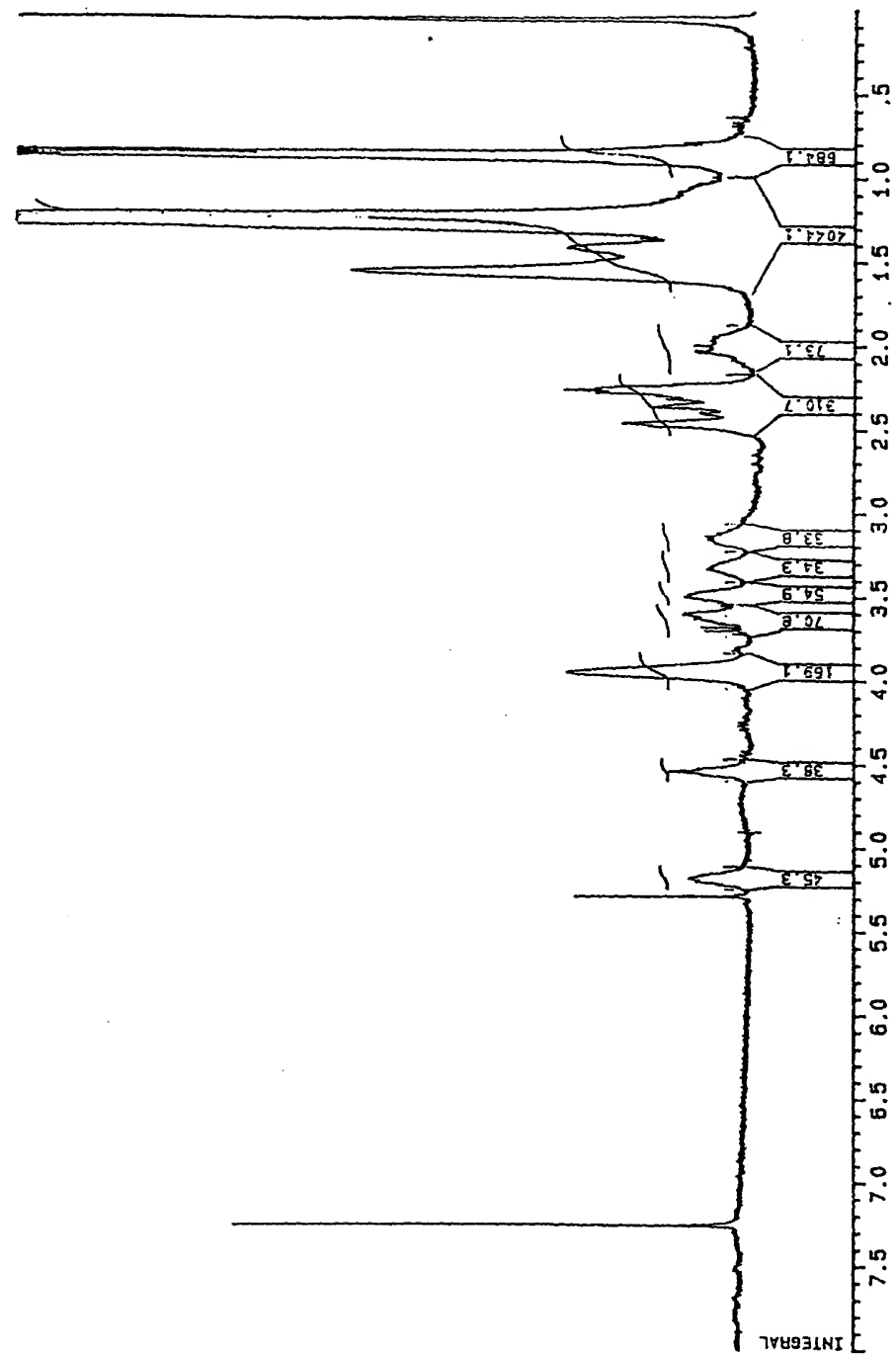
FIGURE 10

MONOPHOSPHATE:  $^{13}\text{C}$ -RMN

11/15

FIGURE 11

MONOPHOSPHATE: 1H-RMN

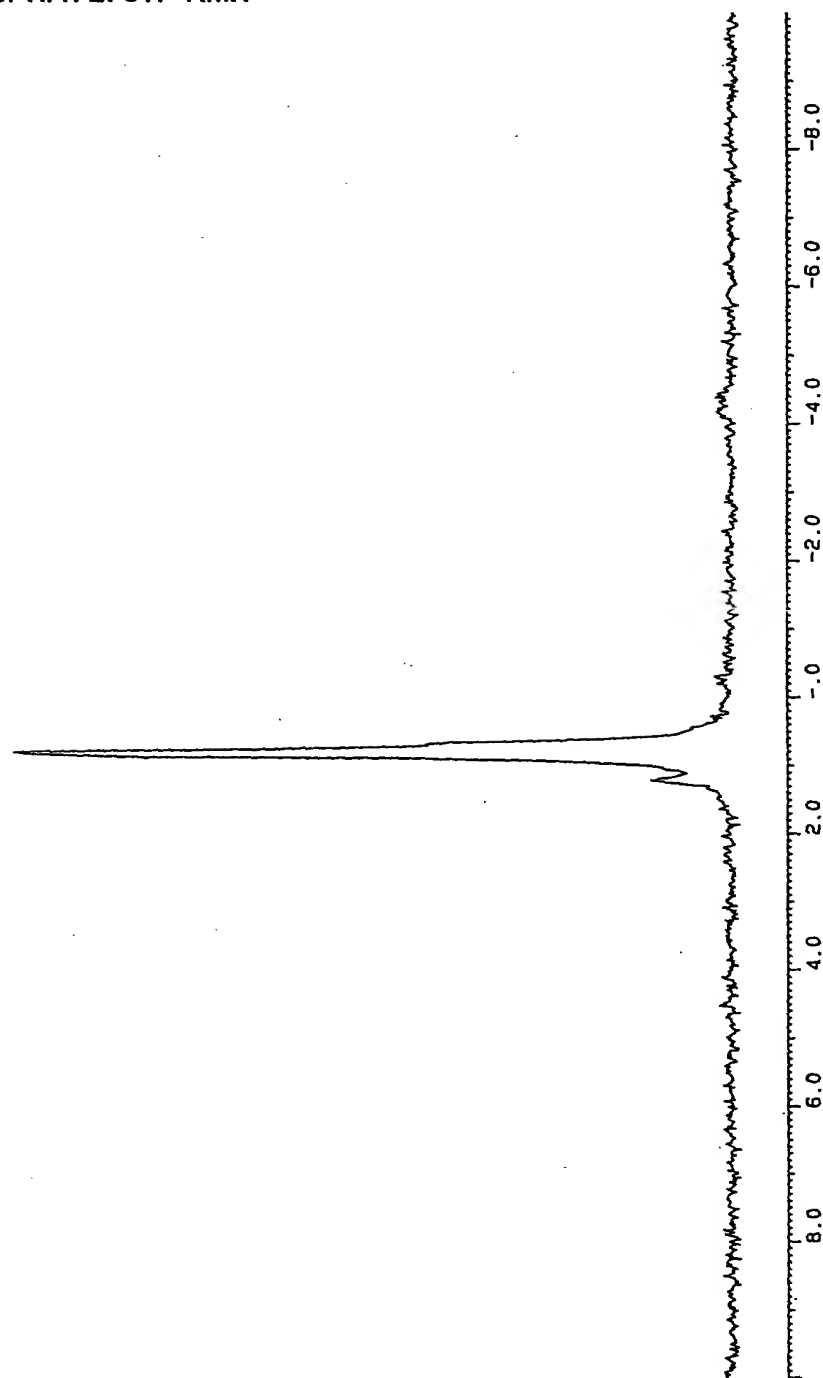


0 8 OCT. 1998

12/15

FIGURE 12

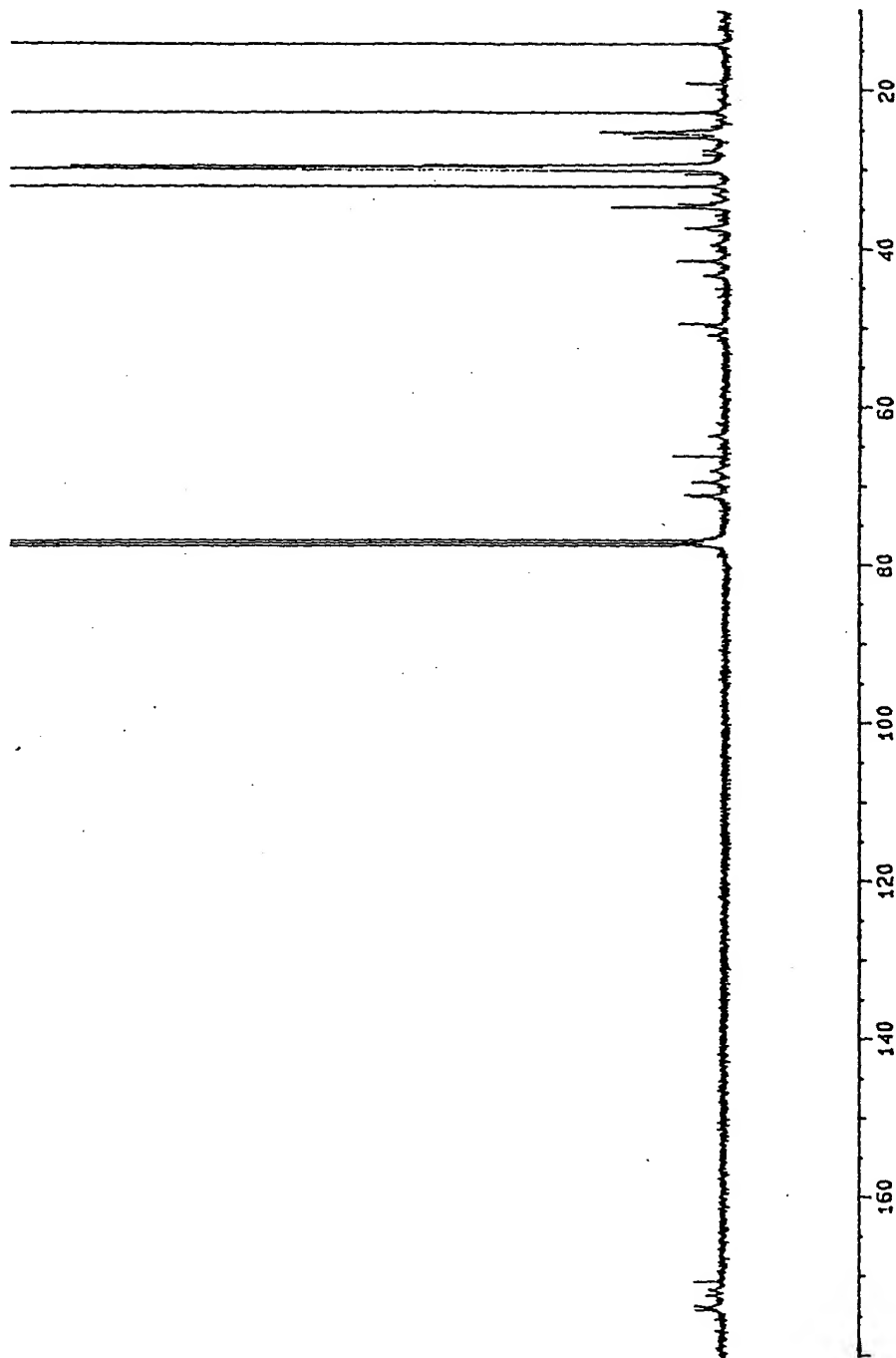
MONOPHOSPHATE:  $^{31}\text{P}$ -RMN



13/15

FIGURE 13

DIPHOSPHATE: 13C-RMN



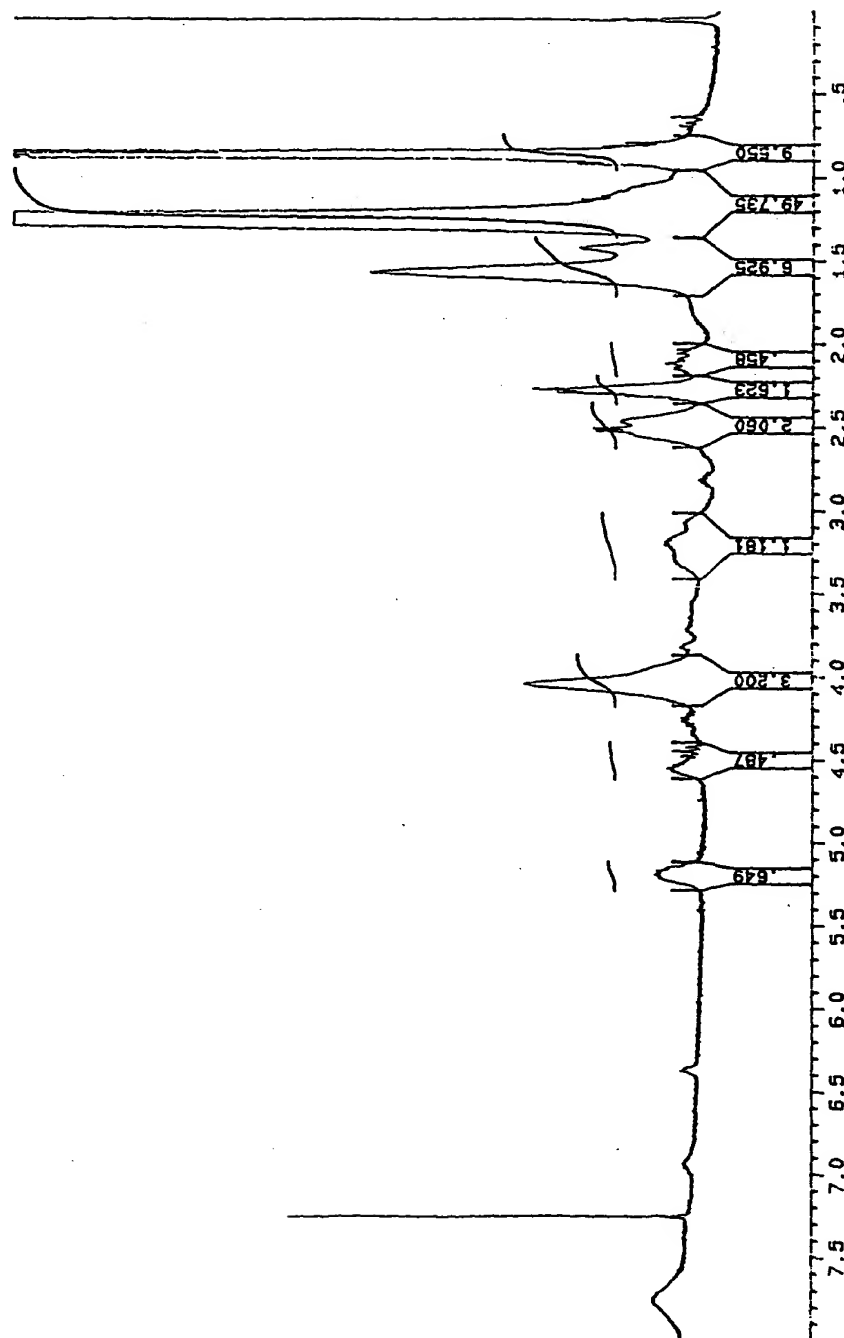


08 OCT. 1998

14/15

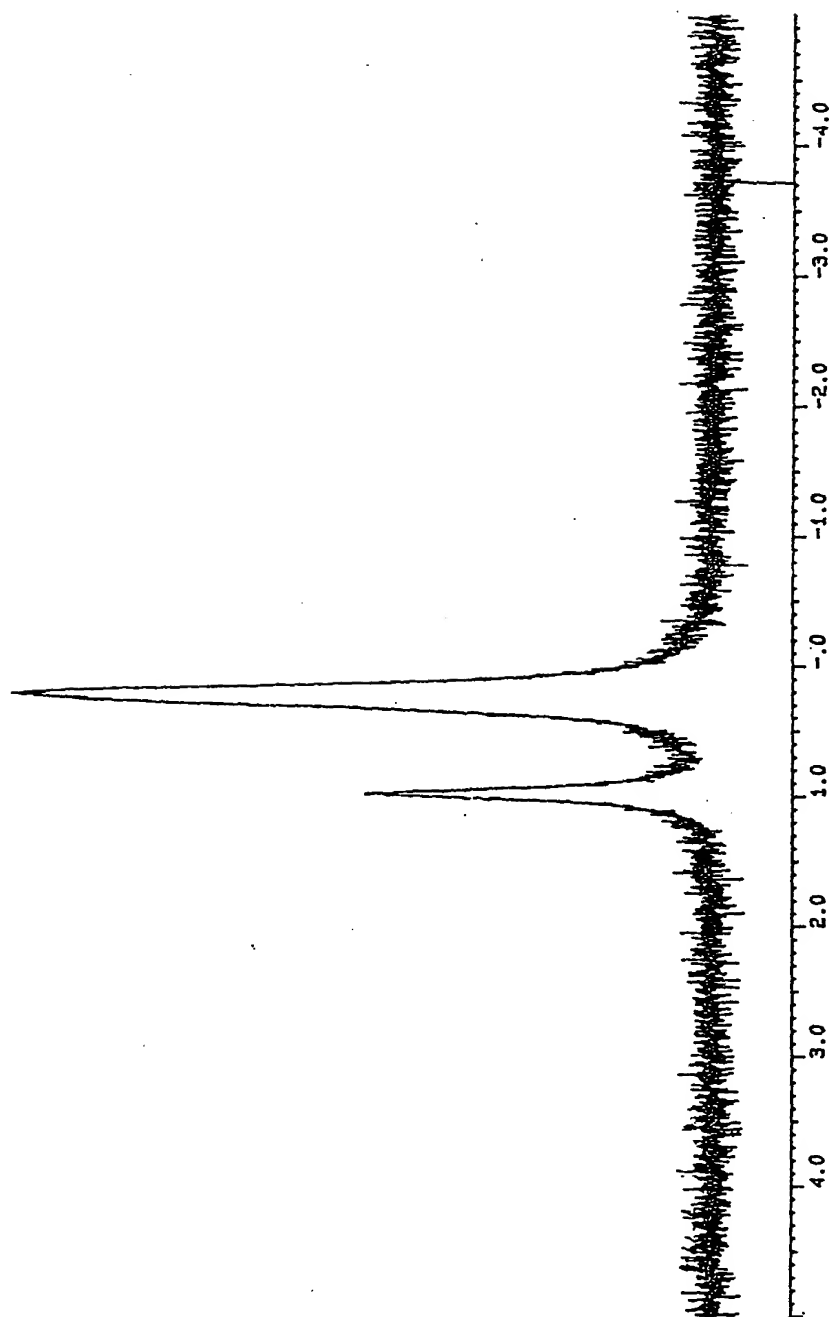
FIGURE 14

DIPHOSPHATE: 1H-RMN



15/15

FIGURE 15

DIPHOSPHATE:  $^{31}\text{P}$ -RMN

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>OM III</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/IB 99/01170</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>23/06/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>30/06/1998</b>
Déposant <b>OM PHARMA et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégi**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégi est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/IB 99/01170

## **Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2. ☒ Les revendications n°s 1-3, 9-19 (all in part)  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
  
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## **Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
  
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-3, 9-19 (all in part)

Les revendications 1-3 et 9-19 présentes ont trait à une très grande variété de composés. En fait, les revendications contiennent tant d'options et de variables, très partiellement supportées par les exemples, que le manque de clarté au sens de l'Article 6 PCT qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires, c'est à dire les revendications 4-8 (composés cités nommément). Une recherche limitée a été effectuée sur les autres revendications, particulièrement limité en ce qui concerne la nature des groupes R1 et R2.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.





# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/IB 99/01170

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07C237/00 C07F9/09 A61K31/66 A61P37/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07C C07F A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 14026 A (OM LAB SA ;DEUTSCHE OM ARZNEIMITTEL GMBH (DE); DAVIES JOHN GWYNFOR) 26 mai 1995 (1995-05-26) ---	4-8
A	EP 0 668 289 A (SUNTORY LTD) 23 août 1995 (1995-08-23) ---	4-8
A	EP 0 224 260 A (TOHO YAKUHI KOGYO KK) 3 juin 1987 (1987-06-03) ---	4-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 069 (C-407), 3 mars 1987 (1987-03-03) & JP 61 227586 A (DAI ICHI SEIYAKU CO LTD), 9 octobre 1986 (1986-10-09) abrégé --- -/--	4-8



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29. 09. 99

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Janus, S



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No

PCT/IB 99/01170

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 8, 25 août 1997 (1997-08-25) Columbus, Ohio, US; abstract no. 109122h, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXIII." page 624; XP002095371 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 6, 1997, pages 1089-1093, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 18, 5 mai 1997 (1997-05-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 238583n, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXII." page 645; XP002095372 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 2, 1997, pages 312-320, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 3, 17 juillet 1995 (1995-07-17) Columbus, Ohio, US; abstract no. 33547v, SUHARA, Y. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXIX." page 902; XP002095373 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 42, no. 12, 1994, pages 2526-2531, -----	4-8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/01170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9514026 A	26-05-1995	AU 700485 B	07-01-1999
		AU 1219495 A	06-06-1995
		BR 9408071 A	24-12-1996
		CA 2175375 A	26-05-1995
		CN 1137799 A	11-12-1996
		CZ 9601418 A	16-10-1996
		EP 0729473 A	04-09-1996
		HU 74738 A	28-02-1997
		JP 9505071 T	20-05-1997
		PL 314494 A	16-09-1996
		SK 61396 A	06-11-1996
EP 0668289 A	23-08-1995	JP 6206893 A	26-07-1994
		AU 679970 B	17-07-1997
		AU 6219694 A	27-03-1995
		US 5654289 A	05-08-1997
		CA 2148824 A	16-03-1995
		WO 9507285 A	16-03-1995
EP 0224260 A	03-06-1987	JP 63030495 A	09-02-1988
		JP 63044588 A	25-02-1988
		JP 62129292 A	11-06-1987
		US 4746742 A	24-05-1988
JP 61227586 A	09-10-1986	JP 1856793 C	07-07-1994
		JP 5069117 B	30-09-1993

